

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO

Dipartimento di Scienze Biomediche per la Salute

Scuola di Dottorato in Scienze biomediche cliniche e sperimentali

Corso di Dottorato di ricerca in Sanità Pubblica - XXV Ciclo



Sorveglianza della circolazione di Poliovirus nella popolazione lombarda nell'ambito del progetto di eradicazione mondiale della poliomielite

Coordinatore: Chiar.ma Prof.ssa Mirella PONTELLO

Tutor: Dott. Sandro BINDA

Tesi di Dottorato di:

Monia GAMBINO

Matr. n°: Ro8706

Anno Accademico 2011-2012

Sommario

1. Premessa	4
2. Introduzione	8
2.1 Il Poliovirus.....	8
2.1.1 Classificazione.....	8
2.1.2 Organizzazione del genoma	13
2.1.3 Struttura del virione.....	14
2.1.4 Ciclo replicativo e assemblaggio delle nuove particelle virali	15
2.1.5 Tropismo cellulare e tissutale: il recettore HPVR (<i>Human PolioVirus Receptor</i>).....	17
2.1.6 Effetti dell'infezione da poliovirus nella cellula ospite	18
2.1.7 Patogenesi.....	18
2.1.8 Infezione e trasmissione virale	20
2.1.9 La risposta immunitaria	21
2.1.10 Sopravvivenza del Poliovirus nell'ambiente e in laboratorio	22
2.2 La poliomielite.....	24
2.2.1 Definizione	24
2.2.2 Cenni storici.....	24
2.2.3 Aspetti epidemiologici	32
2.2.4 Sintomatologia e patologia	32
2.2.5 Diagnosi.....	37
2.2.6 Prognosi	37
2.2.7 Terapia	38
2.2.8 La prevenzione	39
2.3 L'eradicazione della poliomielite.....	52
2.3.1 Il programma di eradicazione della Poliomielite.....	52
2.3.2 Strategie per l'eradicazione.....	54
2.3.3 Storia dell'eradicazione della poliomielite.....	62
2.3.4 Situazione mondiale attuale.....	65
2.3.5 Situazione italiana.....	83
3. Materiali e metodi	85
3.1 La Sorveglianza delle Paralisi Flaccide Acute (PFA)	85
3.1.1 Rete della Sorveglianza delle PFA in Lombardia.....	85

3.1.2	Segnalazione di un caso di PFA.....	87
3.1.3	Preparazione dei campioni biologici.....	88
3.1.4	Metodi virologici.....	89
3.1.5	Il funzionamento della rete negli anni 1997-2009.....	97
3.1.6	Organizzazione della rete negli anni 2010, 2011 e 2012	98
3.1.7	Casistica in studio	99
3.2	La sorveglianza ambientale in Lombardia.....	100
3.2.1	I depuratori indagati	100
3.2.2	Preparazione dei campioni: separazione bifasica.....	101
3.2.3	Metodi virologici.....	102
3.2.4	Il funzionamento della rete negli anni 2006-2009.....	102
3.2.5	Campioni di liquame oggetto dello studio	103
4.	RISULTATI	104
4.1	Sorveglianza delle Paralisi Flaccide Acute (PFA)	104
4.1.1	Risultati della sorveglianza delle PFA nel 2010	104
4.1.2	Risultati della sorveglianza delle PFA nel 2011	106
4.1.3	Risultati della sorveglianza delle PFA nel 2012	108
4.1.4	Attività di sorveglianza nel triennio 2010-2012	111
4.2	Sorveglianza ambientale.....	114
4.2.1	Sorveglianza ambientale	114
4.2.2	Risultati delle analisi sui campioni di liquame: anno 2010	115
4.2.3	Risultati delle analisi sui campioni ambientali: anno 2011	117
4.2.4	Risultati delle analisi sui campioni ambientali: anno 2012	118
5.	DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	119
6.	APPENDICE.....	125
7.	Bibliografia.....	131

1. PREMESSA

I Poliovirus (PV) sono virus a RNA, appartenenti alla famiglia *Picornaviridae*, genere *Enterovirus*, in grado di provocare nell'uomo infezioni che possono presentare un'ampia gamma di manifestazioni, da quadri asintomatici alla paralisi, che è la manifestazione più evidente dell'infezione, ma solo l'1% degli infetti presenta questo sintomo. Esistono 3 tipi di poliovirus, ma il tipo 2 è già stato eliminato e non circola più nella popolazione dal 1999. La trasmissione avviene per via oro-fecale, attraverso l'ingestione di acqua o cibi contaminati o da persona a persona, in seguito all'escrezione attraverso le feci e le secrezioni faringee del virus da parte di soggetti infetti.

La poliomielite è una grave malattia infettiva, soprattutto infantile, causata dai tre tipi di poliovirus (1,2 e 3), a carico del sistema nervoso centrale che colpisce i motoneuroni presenti nelle corna anteriori del midollo spinale. La sintomatologia caratteristica è una paralisi flaccida ad insorgenza acuta, a carico degli arti o del tronco, che nei casi più gravi può essere totale. Nella forma più grave, quella bulbare, il virus paralizza i muscoli innervati dai nervi craniali, riducendo la capacità respiratoria, di ingestione e di parola.

È stata descritta per la prima volta da Michael Underwood, medico britannico, nel 1789 e riconosciuta come malattia contagiosa da Jakob Heine nel 1840, ma è una malattia molto antica, le cui prime tracce compaiono già in una stele egizia. È stata registrata per la prima volta in forma epidemica nell'Europa di inizio XIX secolo e poco dopo negli Stati Uniti. È stata una delle malattie infantili endemiche più temute del XX secolo, causando ingenti epidemie che hanno paralizzato migliaia di persone e provocato centinaia di morti, soprattutto bambini. La diffusione della polio ha raggiunto un picco in Italia nel 1958, quando furono notificati oltre 8mila casi. L'ultimo caso nel nostro paese risale al 1982.

Dopo l'introduzione dei vaccini antipoliomielitici, prima del vaccino a iniezione (IPV) di Salk a metà degli anni '50, e poi con quello orale (OPV) di Sabin agli inizi degli anni '60, e la loro successiva diffusione, l'incidenza della malattia è diminuita drasticamente almeno nei Paesi industrializzati che potevano affrontare il costo della vaccinazione di massa.

La poliomielite è stata per lungo tempo un importante problema di Sanità Pubblica e l'esistenza di ottimi vaccini è tra i presupposti che hanno fatto considerare la possibilità di eliminare l'agente patogeno e la malattia.

Nel maggio 1988 la 41° Assemblea Mondiale della Sanità, costituita dai Ministri della Salute di tutti gli stati membri dell'OMS, stabilì al meeting annuale di Ginevra, l'eradicazione mondiale della poliomielite quale obiettivo da raggiungere entro la fine dell'anno 2000 (1).

Venne così avviata la "Global Polio Eradication Initiative" (GPEI), il più grande progetto di Sanità Pubblica finora realizzato, condotta da OMS, Unicef, Banca Mondiale e US Center for Disease Control and Prevention (CDC) in collaborazione con organizzazioni umanitarie e non governative quali la Croce/Mezzaluna Rossa Internazionale e fondazioni private (Rotary International, Rockefeller Foundation e la Bill and Melinda Gates Foundation), riuniti nel GAVI (Global Allied Vaccines Initiative).

Nel 1988, quando è partito il progetto, la poliomielite era largamente endemica in tutto il mondo con 350.000 casi di malattia stimati in oltre 125 Paesi.

Da quando è stato avviato tale programma sono stati vaccinati contro la polio più di 2,5 miliardi di bambini di età inferiore ai 5 anni in tutto il mondo, permettendo a 5 milioni di persone di evitare la

paralisi. Questo ha richiesto 20 milioni di volontari e un investimento di oltre 8,2 miliardi di dollari, necessari per l'attuazione delle strategie per l'eradicazione, quali la vaccinazione routinaria e quella supplementare (NIDs, e mopping-up) e i programmi di sorveglianza.

La coalizione per l'eradicazione della poliomielite comprende i governi dei Paesi colpiti dalla poliomielite, fondazioni (come la Fondazione delle Nazioni Unite e la Fondazione Bill & Melinda Gates), banche per lo sviluppo (come la Banca mondiale), i governi donatori, la Commissione europea, organizzazioni umanitarie e non governative (come la Croce Rossa Internazionale e la Mezzaluna Rossa) e imprese partner, oltre ai milioni di volontari.

Grazie a questo impegno collettivo e alle misure di Sanità pubblica adottate per il controllo della malattia e la sua prevenzione ad oggi ci sono 3 Paesi endemici (Pakistan, Afganistan e Nigeria) e nel 2012 si registrano 215 casi (dati al 25 dicembre), il più basso mai registrato.

Infatti, nonostante il traguardo non sia stato ancora raggiunto oggi la polio è più strettamente circoscritta che mai, facendo registrare oltre al numero di casi più basso mai riportato, anche il numero inferiore di Paesi endemici e di altri Paesi coinvolti dalla circolazione di poliovirus selvaggi. Nel 2012 non si registrano nuovi outbreak in Paesi non endemici, in quanto l'unico Paese in cui si è verificata l'importazione di poliovirus selvaggi è il Ciad, dove l'outbreak era già in corso nell'anno precedente. In Pakistan e in Afganistan si osserva una riduzione dei casi rispetto all'anno precedente; solo in Nigeria è aumentato. Un altro importante traguardo è rappresentato dalla dichiarazione dell'India come polio-free.

Sembra che l'ultima fase del processo di eradicazione della poliomielite si stia dimostrando molto più difficile di quanto si potesse prevedere. Nonostante le ingenti risorse economiche e l'immenso numero di volontari impiegato, due dei tre poliovirus resistono in alcune roccaforti dove si intrecciano mancanza di acqua potabile, scarse condizioni igienico sanitarie, bassi livelli di copertura vaccinale, scarsa disponibilità o possibilità di accesso ai servizi, difficoltà a raggiungere tutti i bambini, guerra e povertà, mancanza di una corretta informazione, speculazioni politiche e religiose.

Il programma però sta vivendo un livello senza precedenti di priorità e di impegno, in gran parte derivante dalla dichiarazione nel 2012 da parte dell'Assemblea Mondiale della Sanità (WHA) che "il completamento dell'eradicazione della polio è un'emergenza programmatica per la salute pubblica mondiale" (2). Gli Stati membri hanno evidenziato la possibilità di eradicazione a breve termine, ma hanno espresso preoccupazione per un deficit di finanziamento che potrebbe minacciare il raggiungimento dell'obiettivo. La risoluzione esorta tutti i Paesi ancora infetti a dichiarare la polio un'emergenza nazionale di sanità pubblica che richiede l'attuazione di piani di emergenza di controllo ai massimi livelli, invita tutti i Paesi ad applicare le raccomandazioni di vaccinazione per tutti i viaggiatori da/per i Paesi infetti e esorta tutti gli Stati membri a mettere rapidamente a disposizione il fabbisogno finanziario per realizzare un mondo libero dalla polio (3).

Tuttavia la storia mostra come la polio possa essere crudele in quanto può risorge facilmente. Vi è un rischio significativo di avere casi più polio nel 2013 che nel 2012, e in più Paesi. Il programma deve pertanto ricevere un livello di priorità non solo per il controllo di tale rischio, ma per ottenere un altro anno di importanti progressi verso l'arresto della trasmissione (4).

Infatti, l'importazione di poliovirus selvaggio in territori indenni è sempre possibile finché non si sarà giunti all'eradicazione globale della poliomielite.

Anche l'Italia, dichiarata nel 2002 polio-free insieme al resto della Regione OMS Europea, è un Paese a rischio di importazione in quanto, a causa anche della sua posizione geografica, è un punto di passaggio per le popolazioni provenienti dall'Africa, dall'Asia e dall'Est Europa.

Si può pertanto pensare di eradicare la poliomielite solo a patto che in tutto il mondo vengano applicate correttamente ed efficacemente le strategie raccomandate, cioè garantire un'elevata copertura vaccinale e svolgere adeguatamente l'attività di sorveglianza delle Paralisi Flaccide Acute (PFA).

Per garantire un'elevata copertura vaccinale, oltre alla vaccinazione routinaria sono fondamentali le giornate nazionali di immunizzazione (NIDs) e le campagne di moppig-up che vengono messe in atto in Paesi più disagiati dove la copertura routinaria è carente o in Paesi colpiti da epidemie.

L'obiettivo della sorveglianza della PFA è invece l'individuazione dei casi di polio paralitica da poliovirus selvaggi, mediante la segnalazione immediata di tutti i casi di PFA, dovuti a qualsiasi causa, e l'avvio immediato di indagini di laboratorio condotte da strutture qualificate ed accreditate, riunite in un Network mondiale di Laboratori per la Polio (Global Laboratory Polio Network). Infatti, solo grazie agli esiti delle prove virologiche sui campioni di feci di tutti i casi di PFA è possibile attribuire un caso di PFA all'infezione da poliovirus, in quanto la PFA è la manifestazione clinica della poliomielite ma non ne è il segno esclusivo.

La sorveglianza della PFA è una vigilanza attiva ed è considerata dall'OMS il "gold standard" per la sorveglianza dei poliovirus nelle iniziative di eradicazione, in quanto consente di individuare i poliovirus e di correlarli ad individui noti ed alla comunità a rischio. Si è rivelata importante nel garantire non solo l'individuazione immediata di eventuali focolai di poliovirus selvaggio ma anche di casi di paralisi associata a vaccino (VAPP) consentendo di mettere in atto adeguati provvedimenti di Sanità pubblica.

Questo tipo di sorveglianza si attua mediante la segnalazione immediata di tutti i casi di PFA che si manifestino in soggetti di età inferiore a 15 anni nonché di ogni caso di sospetta poliomielite in persone di tutte le età e l'avvio immediato di indagini di laboratorio condotte da strutture qualificate ed accreditate della Global Laboratory Polio Network. Ogni caso di paralisi flaccida acuta deve essere considerato come un'emergenza di Sanità pubblica.

La Commissione Globale di Certificazione (CGC) ha stabilito alcuni indicatori di qualità della sorveglianza della polio e della paralisi flaccida acuta e della cosiddetta "performance" di laboratorio, il cui raggiungimento è indicativo dell'efficienza del sistema di sorveglianza delle malattie infettive e delle infrastrutture sanitarie. Il principale obiettivo è quello della segnalazione dei casi di PFA non-polio con un tasso di 1:100.000 bambini di età inferiore ai 15 anni.

Ogni rete nazionale ha un suo centro coordinatore, a sua volta collegato in una rete globale gestita dall'OMS (5). In Italia la sorveglianza delle PFA è stata avviata nel 1997, prima come progetto pilota che coinvolgeva 4 Regioni (Piemonte, Emilia-Romagna, Umbria, Campania) e poi come rete estesa all'intero territorio nazionale, un sistema di sorveglianza costituito da 20 centri regionali di riferimento, per lo più rappresentati da istituti universitari, coordinati dall'Istituto Superiore di Sanità e dal Ministero della Salute. Il Ministero della Salute, in quanto centro coordinatore, si impegna nell'informazione dell'OMS dalla segnalazione iniziale alla classificazione e la diagnosi clinica finale. Secondo i dati del Ministero dal 1998 al 2011 (per il 2012 i dati non sono ancora disponibili) gli indicatori di performance attesi per i casi di PFA non-polio raramente sono stati raggiunti.

Come supporto alla sorveglianza delle PFA, soprattutto nei Paesi dove questa è carente, come in Italia, è stata in seguito introdotta la sorveglianza ambientale, che si basa sulla ricerca dei poliovirus nei reflui urbani. Il rationale della sorveglianza ambientale si basa sulle caratteristiche di escrezione del poliovirus: ogni individuo infetto (con o senza sintomi) elimina per diverse settimane grandi quantità di poliovirus nelle feci e così nell'ambiente, dove i virus possono mantenere la loro infettività per periodi di tempo variabili a seconda delle condizioni ambientali ma abbastanza lunghi per il loro ritrovamento all'uscita di

una rete fognaria (6). L'OMS considera un singolo caso confermatodi paralisi come l'evidenza di un focolaio epidemico (3).

La sorveglianza ambientale viene quindi considerata una strategia supplementare a quella della PFA per monitorare la circolazione di poliovirus, selvaggi o di derivazione vaccinale, nella popolazione.

La ricerca dei poliovirus vaccinali è importante soprattutto nelle situazioni in cui si ha una copertura vaccinale è insufficiente ed irregolare per cui i ceppi di poliovirus di derivazione vaccinale che possono mutare e riacquistare caratteristiche proprie dei ceppi selvaggi, quali la neurovirulenza, un'elevata trasmissibilità interumana e proprietà antigeniche non "vaccine-like".

Inoltre è possibile che si verifichi una ricombinazione dei poliovirus con enterovirus non-polio eventualmente circolanti, a causa della forte omologia di alcune regioni del genoma, con conseguente formazione di nuovi virus ibridi e insorgenza di nuovi casi di malattia. Pertanto nei reflui urbani vengono anche ricercati gli enterovirus non-polio. Secondo l'OMS, si dovrebbe rilevare la presenza di enterovirus non-polio in almeno il 30% dei campioni di liquame concentrato e la presenza di ceppi Sabin-like in popolazioni immunizzate con OPV soprattutto dopo i NIDs ed altre campagne.

Lo studio di sorveglianza ambientale necessita di metodiche standardizzate affinché i risultati siano confrontabili sia a livello nazionale sia internazionale pertanto tutti i laboratori accreditati seguono le linee guida dell'OMS (6).

Per portare a termine l'obiettivo di eradicazione le attività di sorveglianza, sia clinica che ambientale, dovranno continuare anche dopo il raggiungimento dell'eradicazione della poliomielite, in quanto solo sorvegliando la popolazione si potrà valutare la reale scomparsa del virus e della malattia.

In Lombardia vengono svolte entrambe le attività di sorveglianza e il Centro di Riferimento Regionale (CRR) si trova presso il laboratorio di Virologia del Dipartimento di Scienze Biomediche per la Salute, che si occupa della sorveglianza delle PFA dal 1997 e di quella ambientale dal 2005.

Per condurre la sorveglianza delle PFA il CRR ha costituito una rete di medici ospedalieri che sorvegliano la situazione regionale costituita, al 2012, da 51 referenti che coprono tutte e dodici le province lombarde. Nel triennio oggetto dello studio sono state raccolte 27 segnalazioni e per tutti è stato possibile analizzare almeno un campione di feci per la ricerca dei poliovirus.

Per quanto riguarda la sorveglianza ambientale i campionamenti vengono effettuati con periodicità quindicinale all'ingresso dei depuratori di Nosedo e Peschiera Borromeo, grazie alla collaborazione dell'Agenzia Regionale per la protezione dell'Ambiente (ARPA) della Lombardia. Nei tre anni oggetto dello studio sono stati analizzati 185 campioni di liquame, che sono stati testati per la presenza di poliovirus ed enterovirus non-polio.

2. INTRODUZIONE

2.1 IL POLIOVIRUS

2.1.1 Classificazione

Il Poliovirus *hominis* appartiene alla famiglia delle *Picornaviridae* e al genere Enterovirus (EV); le caratteristiche sierologiche di tale virus consentono di distinguere 3 tipi:

1. Tipo 1: *Brunhilde*, dal nome dello scimpanzé da cui venne isolato per la prima volta (1939)
2. Tipo 2: *Lansing*, dalla città del Michigan dove, nel corso di un'epidemia, un paziente venne ucciso da un virus identificato come tale (1938)
3. Tipo 3: *Leon*, dal nome di un bambino morto a Los Angeles per l'infezione da questo tipo di virus (1930)

2.1.1.1 Famiglia delle *Picornaviridae*

Il nome "*Picornaviridae*" deriva da *pico* che significa piccolo e *RNA* con riferimento alla molecola costituente il loro genoma.

Il nucleocapside è di forma sferica ha un diametro di 28-30 nm ed è formato dal capsid e dal genoma; l'assenza di envelope lipidico conferisce loro l'insensibilità ai solventi organici. Il capsid icosaedrico è costituito da 32 capsomeri ed è composto da 4 proteine: VP1-VP2-VP3-VP4 (Figura 1). Il loro genoma è costituito da RNA lineare a singolo filamento (single strand RNA, ssRNA) di 7.2-8.5 Kb a polarità positiva. A questa famiglia appartengono molti agenti virali infettanti umani tra cui i più comuni e rilevanti dal punto di vista clinico nella specie umana, come gli Enterovirus e i Rhinovirus (Figura 2).

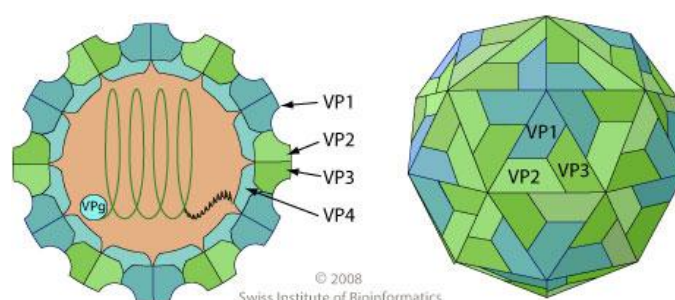


Figura 1. Struttura del virione delle *Picornaviridae*

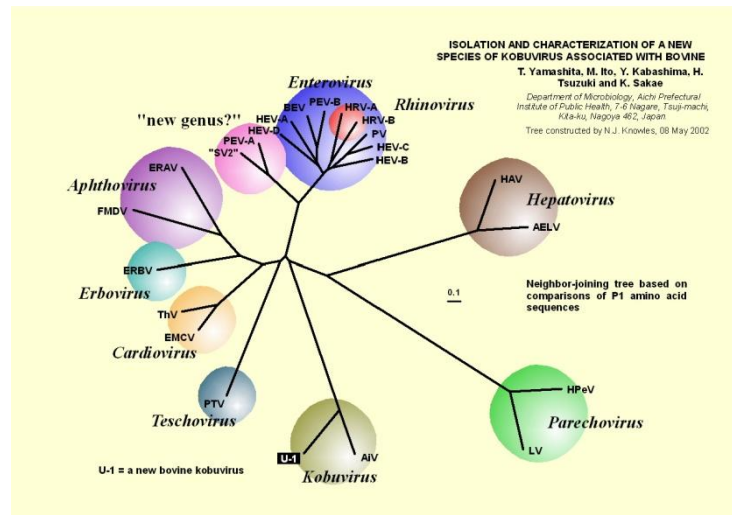


Figura 2. Classificazione delle Picornaviridae

2.1.1.2 Genere Enterovirus

Gli Enterovirus, così chiamati perché si moltiplicano a livello enterico, sono virus ubiquitari responsabili di una vasta gamma di sindromi cliniche che vanno da lievi sintomi respiratori a condizioni gravi, tra cui meningite asettica, encefalite e paralisi flaccida acuta. Gli Enterovirus si identificano, dal punto di vista tassonomico, in base ad alcune caratteristiche comuni (7):

- simmetria di tipo icosaedrico dei virioni;
- diametro compreso tra 25 e 30 nm;
- ssRNA(+) di peso molecolare $2,5-2,8 \cdot 10^6$ Kd, che rappresenta il 20-30% del virione intero;
- riproduzione a 37°C ;
- resistenza a pH compresi tra 3 e 9;
- resistenza ai solventi lipidici (inclusi etere e cloroformio) di strutture pericapsidiche;
- in sospensione acquosa vengono distrutti se riscaldati a $50-55^\circ\text{C}$ per 30 minuti, invece nel latte e derivati sopravvivono fino alla temperatura di 60°C ;
- resistenza ai disinfettanti (per es. alcol etilico, composti quaternari dell'ammonio, lo stesso etere, ecc.) che comunemente distruggono altri virus;
- stabilità per molti anni alle temperature di congelamento (tra -20 e -80°C), per settimane a temperature da frigorifero ($+4^\circ\text{C}$) e per giorni a temperatura ambiente;
- rapida inattivazione da parte di disinfettanti come la formaldeide ed ossidanti energici quali ozono, cloro e iodio (ma se è presente materia organica estranea il virus è protetto);
- inattivazione a tutte le temperature ambientali inibita da MgCl_2 (ciò ha suggerito l'utilizzo di tale sostanza come stabilizzante del vaccino antipolio orale, OPV);
- inattivazione da luce ultravioletta, trattamenti di pastorizzazione ed essiccamento.

Fino agli anni Sessanta, gli Enterovirus erano divisi in:

- Poliovirus, comprendente i tre sierotipi che provocano poliomielite paralitica umana
- Coxsackievirus con i sottogruppi Coxsackie A e B

- Echovirus, il prefisso *echo* è un acronimo per *Enteric Cytopathogenic Human Orphan*, poiché erano stati isolati in soggetti sani ed erano “orfani” di una patologia

La nomenclatura successiva, basata su rigorosi confronti delle omologie del genoma virale, ha prodotto cinque specie in cui vengono distribuiti 62 dei 64 sierotipi:

1. Poliovirus rimasti immutati in numero e denominazione (Poliovirus umano 1, 2, 3)
2. Enterovirus umano A, che comprende 10 sierotipi: Coxsackievirus A2, A3, A5, A7, A8, A10, A12, A14, A16 ed Enterovirus umano 71
3. Enterovirus umano B, che comprende 36 sierotipi: Coxsackievirus A9, B1-B6, Echovirus 1-7, 9, 11-21, 24-27, 29-33 ed Enterovirus umano 69
4. Enterovirus umano C, che comprende 11 sierotipi: Coxsackievirus A1, A11, A13, A15, A17-A22 e A24
5. Enterovirus umano D, che comprende 2 sierotipi: Enterovirus umano 68 e 70

A sé stanti, per ora, Coxsackievirus A4 e A6.

Gli Enterovirus di più recente scoperta vengono denominati attraverso una serie di numeri consecutivi (ad es. EV68, EV69 etc.)

2.1.1.2.1 **Enterovirus non poliomielitici o non-polio (NPEV)**

Le infezioni da enterovirus sono ubiquitarie e molto diffuse; prediligono l'infanzia e compaiono spesso in forma epidemica nelle comunità, con maggior frequenza durante i mesi estivo-autunnali. Sono molto contagiose e, di frequente, subcliniche.

I fattori determinanti per la loro diffusione sono gli stessi che valgono per i poliovirus: latitudine e fattori ambientali, sanitari e socioeconomici.

Per quanto riguarda le infezioni da **enterovirus 68-71** :

- 68, 69, 70: esantemi vescicolari (68 → polmoniti/bronchioliti);
- 70, 71: meningiti e meningo-encefaliti, paralisi flaccida simil-polio;
- 70: congiuntivite acuta emorragica (impianto diretto nella congiuntiva diversamente dalla modalità di infezione degli altri enterovirus, oro-fecale). Es. Giappone 1971;
- 71: malattie simil-influenzali, malattia “mano-piede-bocca”.

COXSACKIEVIRUS

STORIA E CLASSIFICAZIONE

I virus Coxsackie sono stati scoperti nel 1948-49 da Gilbert Dalldorf, presso il *New York State Department of Health* di Albany (New York) durante lo studio di una cura per la poliomielite. Il termine “*coxsackie*” deriva infatti dal nome di un piccolo paese sul fiume Hudson nello stato di New York dove Dalldorf aveva ottenuto i primi campioni di feci.

Sono stati divisi in due gruppi in base alla patologia che causavano nei topi durante i primi studi, il gruppo A che comprende 23 sierotipi (1-22, 24) e il gruppo B 6 (1-6) (8).

Al gruppo A appartenevano i coxsackievirus che provocavano paralisi e morte del topo, con una estesa necrosi del muscolo scheletrico, mentre i coxsackievirus del gruppo B causavano infezioni meno gravi rispetto agli A, ma un danno che toccava molti più organi, compresi cuore, pancreas, cervello, fegato e

muscolo scheletrico. Alcuni coxsackie A appartengono al gruppo degli Enterovirus umani A (2, 3, 5, 7, 8, 10, 12, 14, 16), altri al gruppo C (1, 11, 13, 15, 17-22, 24) mentre il coxsackievirus A9 e i coxsackievirus B appartengono al gruppo degli Enterovirus umani B; due coxsackie, A4 e A6, non sono ancora stati assegnati a nessuna specie.

PATOLOGIE

Più del 90% delle infezioni sostenute dai coxsackievirus sono asintomatiche; i coxsackievirus di entrambi i gruppi possono causare uno stato febbrile aspecifico, rash cutaneo, patologie dell'alto tratto respiratorio e, nei casi più gravi, meningite asettica ed encefalite, di solito sostenuta da sierotipi A9, B2 e B5 (Tabella 1). L'infezione è molto comune nei bambini e nei neonati, nei quali sono la principale causa di febbre durante le stagioni estiva e autunnale.

La più famosa patologia provocata da Coxsackie A è la malattia mano-piede-bocca, una comune malattia febbrile infettiva pediatrica, caratterizzata da esantema vescicolare sulla cute, in particolare dei palmi di mani e piedi e sulla mucosa orale e palato, usualmente collegata al sierotipo A16, ma sostenuta anche da altri Enterovirus quale l'enterovirus 71. I coxsackievirus A causano anche erpangina e congiuntivite emorragica acuta, di solito sostenuta di solito dal sierotipo A24. Raramente possono provocare paralisi flaccida acuta, come quella dovuta ai poliovirus e sindrome di Guillain-Barré sostenuta dai sierotipi A2, A5 e A9.

L'infezione da Coxsackievirus B può causare pleurodinia o Malattia di Bornholmes, miocardite e pericardite, con un conseguente danno permanente al cuore. Secondo recenti ipotesi, il virus Coxsackie B4 produrrebbe alterazioni a carico delle cellule beta del pancreas, risultando quindi come possibile fattore eziologico del Diabete Tipo I insulino-dipendente.

1. Aseptic meningitis	A	2, 4-7, 9, 10, 12, 16
	B	All
2. Paralytic disease	A	4, 7, 9
	B	3-5
3. Herpangina	A	1-6, 8-10, 16, 21, 22
4. Hand-foot-mouth disease	A	16 (rarely 4, 5, 9, and 10)
5. Fever, exanthema	A	2, 4, 9, 16
	B	4
6. Acute URTI (cold)	A	2, 10, 21, 24
	B	2-5
7. Epidemic pleurodynia	A	(very rarely)
	B	1-5
8. Myocarditis of the newborn	B	2-5
9. Myocarditis in children	B	2-5
10. Pericarditis	B	1-5
11. Undifferentiated febrile illness	All	All

Tabella 1. Manifestazioni cliniche associate ai coxsackievirus A e B
(Fonte: www.virology-online.com)

ECHOVIRUS

STORIA E CLASSIFICAZIONE

Gli echovirus sono stati isolati per la prima volta da campioni di feci di bambini asintomatici nei primi anni '50 durante uno studio epidemiologico sui poliovirus. Durante i primi studi veniva osservato che gli echovirus provocavano un effetto citopatico sulle colture cellulari ma non veniva rilevata alcuna patologia nei topi. Infatti il termine "echo" è l'acronimo di Enteric Cytopathic Human Orphan, ovvero virus enterico citopatico umano orfano, cioè non associato a nessuna malattia conosciuta (8).

Nonostante gli echovirus siano stati successivamente messi in correlazione con varie patologie, il nome originale è ancora in uso.

Comprendono 28 sierotipi (1-7, 9, 11-21, 24-27, 29-33) appartenenti alla specie degli Enterovirus umani di tipo B.

PATOLOGIE

Gli echovirus, come i Coxsackie A e B, causano tipicamente una lieve e non specifica sindrome febbrile che colpisce soprattutto i bambini e i neonati. Le infezioni nelle prime due settimane dalla nascita possono causare malattie devastanti e potenzialmente fatali, quali meningite asettica, encefalite e miocardite (9). Nei bambini più grandi e gli adulti hanno una prognosi migliore; la miocardite è la complicazione più frequente negli adulti. Gli Echovirus possono anche produrre un rash che si estende dalla faccia fino al collo, a volte anche fino al torace e problemi respiratori. Raramente possono causare la sindrome di Guillain-Barré, sostenuta dai sierotipi 6 e 22.

Le infezioni da virus echo possono determinare:

- sindromi neurologiche: meningite asettica seguita da nevrosite;
- esantematiche: esantemi maculari o maculo-papulari;
- enteriche: diarrea;
- respiratorie: raffreddore comune, faringotonsillite, malattia respiratoria acuta, laringotracheobronchite.

Syndrome	Polio	Cox A	Cox B	Echo
Paralytic disease	+	+	+	+
Meningitis-encephalitis	+	+	+	+
Carditis	+	+	+	+
Neonatal disease	-	-	+	+
Pleurodynia	-	-	+	-
Herpangina	-	+	-	-
Rash disease	-	+	+	+
Respiratory infections	+	+	+	+
Undifferentiated fever	+	+	+	+
Diabetes/pancreatitis	-	-	+	-
Disease in immunocomp.	+	+	-	+

Tabella 2. Sindromi associate ai poliovirus e agli enterovirus non-poliomielitici o non-polio
(Fonte: www.virology-online.com)

2.1.2 Organizzazione del genoma

Il genoma dei poliovirus è una molecola di RNA a singola elica con polarità positiva della lunghezza di circa 7500 nucleotidi.

All'estremità 3' è costituito da una coda di poli (A), composta da circa 62 residui di adenina che ha l'effetto di intensificare fortemente l'inizio della traduzione del genoma virale (10). L'intera regione 3'-UTR dei poliovirus non è richiesta per l'infettività sebbene la sua mancanza diminuisca l'infettività e risulti in una scarsa replicazione virale. Questa regione è corta e contiene una struttura secondaria che sembra implicata nel controllo della sintesi dell'RNA virale. L'estremità 5' presenta una lunga regione non codificante con una struttura complessa che comprende le sequenze che regolano la trascrizione e la traduzione. Ad essa è legata covalentemente la proteina VPg (Virion Protein genome linked), costituita da 22-24 amminoacidi. VPg non è indispensabile per l'infettività, ma è presente sia sulle catene nascenti di RNA sia sull'intermedio a polarità negativa; ciò ha suggerito che VPg, uridilata grazie ad una reazione catalizzata dall'RNA polimerasi RNA-dipendente virale, venga impiegata come primer durante la replicazione (Figura 3). La regione 5'-UTR contiene l'elemento IRES (*Internal Ribosome Entry Site*) che promuove l'inizio della traduzione dell'RNA messaggero (mRNA).

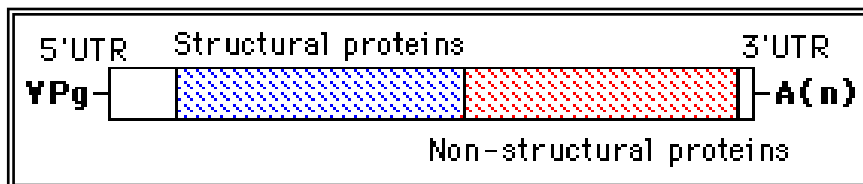


Figura 3. Struttura del genoma dei poliovirus

Studi di biochimica e successivamente la determinazione della sequenza nucleotidica del genoma di poliovirus hanno rivelato la presenza di un'unica lunga *open reading frame* sull'RNA virale che codifica per una catena polipeptidica di circa 2207 amminoacidi indicata con il termine di poliproteina. Quest'ultima, durante la traduzione, viene clivata grazie a proteinasi codificate dal virus portando all'ottenimento di 11 o 12 prodotti finali invece della sintesi del prodotto a piena lunghezza. Questa cascata di eventi produce non solo polipeptidi maturi ma anche altre molecole che hanno il compito di rendere l'ambiente cellulare favorevole alla replicazione virale.

Per unificare la nomenclatura delle proteine dei picornavirus, le tre regioni in cui è suddivisa la poliproteina (Figura 4) sono indicate rispettivamente con:

- 1) **P1**: codifica per le proteine del capside;
- 2) **P2** } codificano per le proteine coinvolte nel processamento del trascritto
- 3) **P3** } iniziale e nella replicazione del genoma (11).

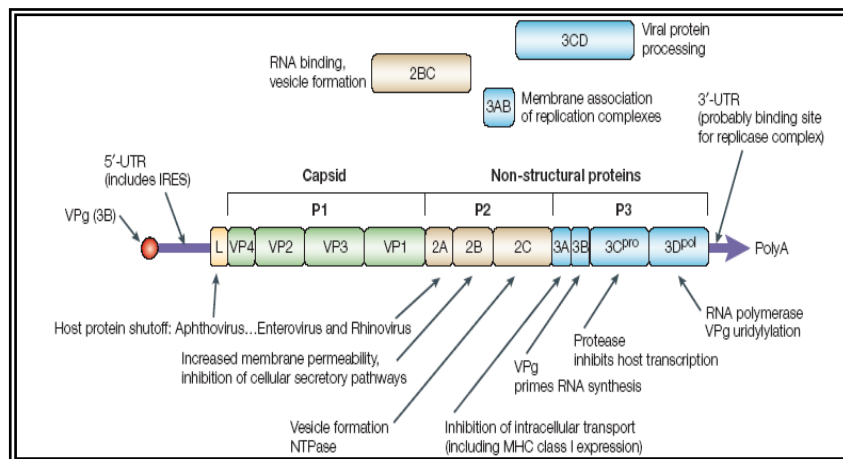


Figura 4. Mappa del clivaggio della poliproteina

Per quel che concerne la replicazione del genoma dei poliovirus, essa ha luogo in particolari complessi di replicazione e dipende dalla RNA-polimerasi-RNA-dipendente 3D, che è il polipeptide più conservato tra i membri della famiglia delle *Picornaviridae*.

Questa RNA-polimerasi è incline a errori di replicazione quali mutazioni frame-shift o l'errata lettura di 1 o 2 nucleotidi con conseguente sostituzione aminoacidica; ne risulta che i poliovirus vanno incontro a rapide mutazioni nell'ospite, le quali sono poi alla base della riacquisizione della neurovirulenza che, seppur raramente, avviene nelle particelle virali acquisite mediante vaccino di Sabin.

2.1.3 Struttura del virione

Il virione del Poliovirus, analogamente agli altri picornavirus, ha una forma approssimativamente sferica con un diametro di 25-28 nm, privo dell'involucro lipidico.

Il genoma, costituito da ssRNA(+), rappresenta il **core** ed è circondato da un sottile guscio proteico, il **capside**, che assolve delle importanti funzioni. Tra queste:

- protegge il genoma da nucleasi ambientali;
- contiene le indicazioni per selezionare ed impaccare il genoma virale;
- nelle fasi iniziali dell'infezione, grazie al riconoscimento di specifici siti recettoriali, permette l'attacco alla membrana plasmatica e, di conseguenza, il rilascio del genoma virale nel citoplasma della cellula-ospite suscettibile. E' quindi un determinante per il range d'ospite e la patogenesi della malattia;
- probabilmente è coinvolto anche nel processo di maturazione del virione.

Per quanto concerne la sua struttura, il capsid è isometrico, a simmetria icosaedrica ed è molto compatto: è composto da 60 protomeri, ciascuno dei quali contiene una copia di tutte le 4 proteine strutturali non identiche (VP1, VP2, VP3, VP4). VP1, VP2 e VP3 formano il guscio esterno, dove possono interagire con anticorpi ed altri reagenti che caratterizzano la superficie cellulare, mentre VP4 giace sulla superficie interna in stretta associazione col core di RNA. Il precursore di VP2 e VP4 è VP0, che rimane non clivato fino all'inclusione dell'RNA nei virioni nascenti (11) (Figura 5).

Il sierotipo è determinato dalle proteine esterne del capsid, che contengono i siti antigenici maggiori.

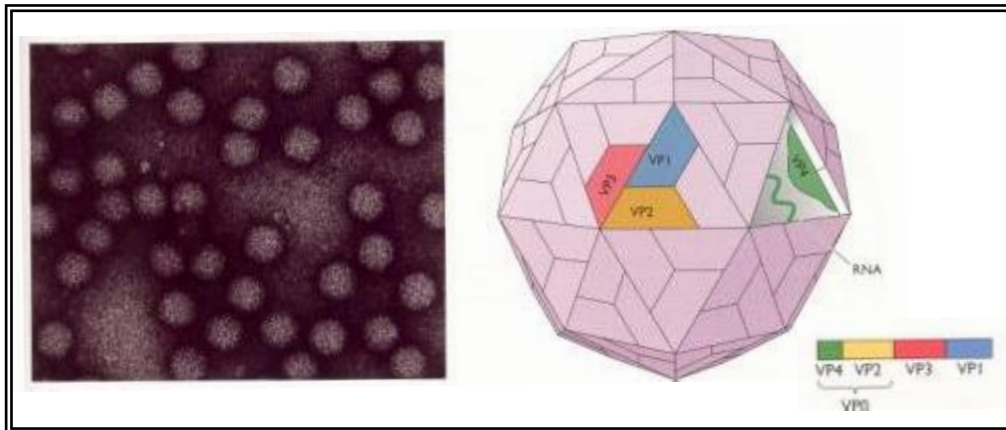


Figura 5: Struttura del capsid dei poliovirus

Studi di cristallografia a raggi-X dimostrano che sulla superficie virale ci sono delle piattaforme sporgenti a forma di stella circondate da depressioni profonde (“canyon”) che fungono da siti di interazione con i recettori cellulari (11).

2.1.4 Ciclo replicativo e assemblaggio delle nuove particelle virali

Il ciclo replicativo dei poliovirus ha modalità comuni a tutti gli altri picornavirus (12) ed ha luogo interamente nel citoplasma cellulare.

L’evento iniziale dell’infezione è l’attacco del virione al recettore HPVR (Human PV Receptor) localizzato sulla membrana plasmatica della cellula. Le particelle risultanti da tale interazione, sono chiamate *particelle alterate*, o *particelle A*, in quanto contengono l’RNA virale ma hanno perso la proteina capsidica interna VP4. Inoltre espongono sulla loro superficie la regione N-terminale di VP1 che, essendo lipofila, aumenta l’affinità delle particelle per le membrane biologiche (13), consentendone l’inserimento con successiva formazione di un poro attraverso il quale l’RNA virale passa nel citoplasma (Figura 6). Sebbene si ritenga che il genoma del poliovirus attraversi la membrana cellulare, non è noto se quest’evento avvenga a livello della membrana plasmatica o degli endosomi.

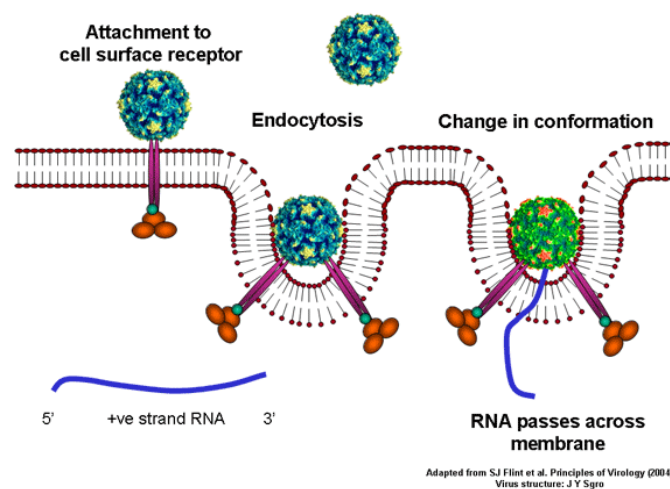
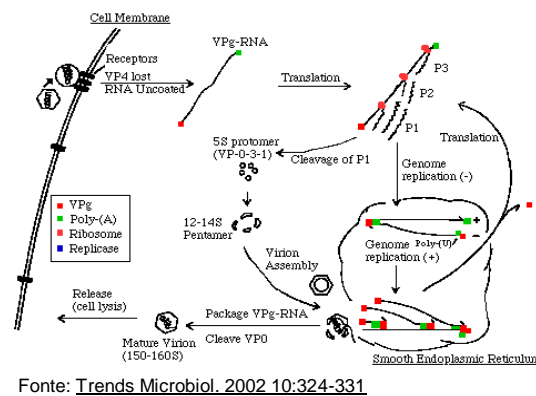
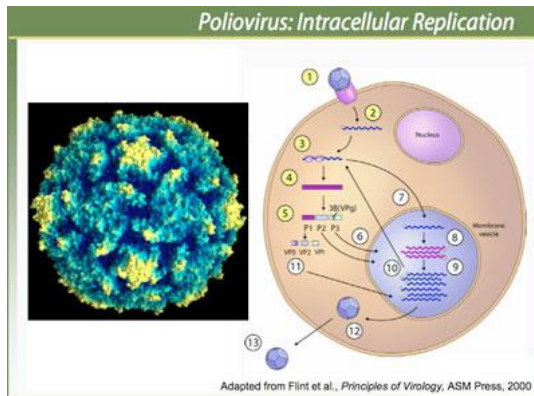


Figura 6. Ciclo replicativo dei poliovirus: fase di penetrazione

Il genoma virale una volta nel citoplasma viene tradotto sfruttando le strutture della cellula ospite che presiedono alla sintesi proteica (Figura 7): i ribosomi non scansionano l'RNA virale dall'estremità 5'-UTR a causa della mancanza del CAP, ma si legano all'IRES (Internal Ribosome Entry Site) contenuto nella regione 5'-UTR. VPg è rimossa da un enzima cellulare di *unlinking* (14).



Fonte: Trends Microbiol. 2002 10:324-331

Figura 7. Ciclo replicativo intracellulare dei poliovirus

Dalla traduzione del filamento di RNA virale si ottiene la sintesi di una poliproteina, subito proteoliticamente clivata da proteinasi virali a dare proteine precursori P1, P2 e P3. Dalla proteolisi di questi frammenti hanno luogo alcuni importanti prodotti (11):

- ✓ una proteina che dà origine a VPg ed è probabilmente necessaria per iniziare la sintesi dell'RNA;
- ✓ una RNA polimerasi RNA-dipendente ($3D^{pol}$) richiesta per copiare il filamento di (+)RNA in un filamento (-)RNA complementare;
- ✓ le proteasi $2A^{pro}$ e $3C^{pro}$, rilasciate dalla poliproteina tramite autoclivaggio e necessarie per scindere le proteine virali.

Dopo il distacco da P2, la proteina P1 viene ulteriormente suddivisa in VP0+VP3+VP1. L'assemblaggio di una copia di VP0, VP1 e VP3 dà origine al protomero 5S. Cinque protomeri 5S si autoassemblano in un pentamero 14S. I pentameri a loro volta si assemblano a formare capsidi vuoti 80S che, associati al genoma virale (esclusivamente ssRNA+), costituiscono i provirioni 150S in cui VP0 è intatto.

Il clivaggio di VP0 in VP2 e VP4 rappresenta la fase finale del processo morfogenetico che porta alla formazione dei virioni maturi 160S che vengono rilasciati mediante lisi cellulare.

Nelle cellule infettate dai poliovirus, il (+)RNA è amplificato attraverso un intermedio a polarità negativa. Nella cellula sono state identificate tre forme di RNA:

- ✓ ssRNA, il più abbondante, esclusivamente a polarità positiva;
- ✓ Replicative Intermediate (RI), RNA di lunghezza piena a polarità positiva con associati filamenti nascenti negativi;
- ✓ Replicative Form (RF), struttura a doppio filamento, che consiste di una copia di lunghezza piena del filamento positivo e di quello negativo.

Come la concentrazione delle proteine aumenta, una frazione crescente del (+)RNA nel complesso replicativo viene impaccata nei virioni. Particelle virali complete vengono infine rilasciate tramite la distruzione della cellula ospite.

2.1.5 Tropismo cellulare e tissutale: il recettore HPVR (*Human PolioVirus Receptor*)

Il recettore per poliovirus HPVR, conosciuto anche come CD155, è stato clonato e sequenziato. E' un "orphan receptor" in quanto non è noto quale sia il suo ligando endogeno: la sola funzione finora nota è quella di legare ed internalizzare il poliovirus (15). Il locus per il recettore risiede sul cromosoma 19, il quale porta tutte le informazioni necessarie per l'accettazione dei poliovirus da parte delle cellule umane: ciò suggerisce che un singolo gene codifica per la proteina recettoriale.

Il clonaggio del gene per l'HPVR ha rivelato che questo recettore è una proteina integrale di membrana ed un membro della superfamiglia delle immunoglobuline con tre domini extracellulari "Ig-like" (16), il primo dei quali contiene il sito di legame per poliovirus (Figura 8).

Le cellule di alcuni distretti corporei nell'uomo esprimono tale recettore e pertanto possono essere infettate ed uccise dal virus: encefalo, fegato, polmoni, placenta, placche del Peyer, tonsille, leucociti, cellule follicolari dendritiche e linfociti B (17). Sebbene l'espressione del recettore HPVR influenzi la distribuzione dell'infezione, sembra esistere una non perfetta correlazione tra l'espressione del recettore in un particolare tessuto e la distribuzione del virus in quel tessuto. Ad esempio i livelli di HPVR espresso sono più alti nel fegato, nei polmoni e nel cuore piuttosto che nel cervello, ma questi tessuti viscerali non sono normalmente infettati dal poliovirus (18).

E' noto che le cellule murine non sono suscettibili all'infezione da poliovirus perché mancano di recettori cellulari (19), ma sono permissive alla replicazione dei virus poliomielitici. I topi transgenici per il CD155 esprimono la proteina sui neuroni sviluppando la poliomielite seguita dalla diffusione intracerebrale ed intramuscolare del virus. Ciò indica il ruolo cruciale del recettore HPVR nelle infezioni dei poliovirus sui neuroni. Tuttavia questi topi mostrano alterazioni del ciclo di trasmissione oro-fecale restando resistenti all'infezione per via orale, la via naturale dell'infezione nell'uomo, probabilmente a causa di un blocco post-recettoriale della replicazione nelle cellule intestinali di topo (20). Le cellule di topi modificate geneticamente in modo che esprimano tale recettore sono usate in laboratorio per l'isolamento del virus dai campioni biologici.

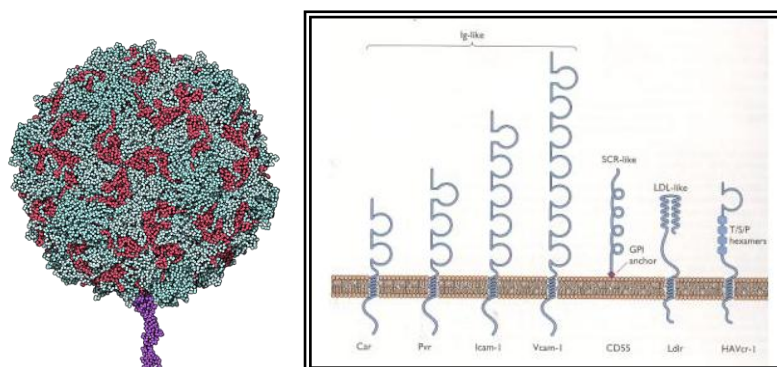


Figura 8. Struttura del recettore per poliovirus (HPVR)(Fonte: www.wikipedia.org)

Quindi altri fattori, oltre al HHVR, giocano un ruolo importante nel determinare la distribuzione dell'infettività virale (21). Includono la via d'ingresso del virus, fattori specifici della cellula e del tessuto-ospite ed elementi del genoma virale. Questi ultimi, agendo sull'efficienza della replicazione o dell'inizio traduzione, influenzano la crescita del virus in cellule specifiche. Ad esempio le sequenze IRES hanno un ruolo chiave nella neurovirulenza (22). Anche le proteine del capsido virale, che interagiscono con il recettore cellulare, possono influenzare il tropismo.

2.1.6 Effetti dell'infezione da poliovirus nella cellula ospite

Il primo effetto prodotto dai poliovirus sulla cellula ospite è il blocco della sintesi proteica cellulare. Ciò si ottiene modificando un fattore cellulare, eIF4G, che fa parte del complesso proteico in grado di ancorare i ribosomi all'mRNA. Tale fattore, opportunamente modificato tramite clivaggio ad opera della proteasi virale 2A_{pro} perde la sua normale funzione, ma stimola la traduzione virale IRES-dipendente (23). Il poliovirus inibisce la sintesi proteica della cellula ospite al fine di poterne utilizzare le risorse: l'esclusiva inibizione della sintesi proteica cellulare e non di quella virale si basa sul fatto che l'RNA del PV, a differenza dell'mRNA cellulare, non è caratterizzato dalla presenza del "cap" in 5' (11).

Il virus inibisce la traduzione dell'mRNA cellulare, ma sfrutta l'apparato di sintesi proteica della cellula-ospite per tradurre in maniera efficiente il proprio genoma. Pertanto la cellula suscettibile fornisce l'energia ed i precursori per la sintesi delle componenti virali, il complesso di traduzione (ribosomi, enzimi, etc) per la sintesi della poliproteina e le membrane richieste per l'assemblaggio dei virioni.

Oltre al blocco della traduzione si assiste al blocco della sintesi di RNA cellulare ad opera di tutte le classi di RNA polimerasi DNA-dipendenti. Il virus agisce tramite la proteasi 3C_{pro} non direttamente sulle RNA polimerasi, ma sulle proteine accessorie (24) (25).

A seguito dell'infezione da parte di poliovirus si verificano anche modifiche morfologiche a carico della cellula ospite, come il condensamento della cromatina, la proliferazione delle vescicole membranose, variazioni nella permeabilità della membrana plasmatica. Tutto ciò prende il nome di "effetto citopatico". Un'ipotesi sul meccanismo che lo provoca riguarda il rilascio del contenuto dei lisosomi (26). È comunque abbastanza certo che non si tratti di apoptosi perché anch'essa bloccata da un inibitore virale (27).

2.1.7 Patogenesi

I poliovirus, al pari degli altri enterovirus, penetrano nell'organismo per via orale e grazie alla loro acido-resistenza passano inalterati la barriera costituita dal basso pH gastrico. Dopo una fase di moltiplicazione nelle cellule epiteliali della mucosa faringea e di quella intestinale, l'infezione si propaga al tessuto linfoide associato alle mucose, come le formazioni linfatiche dell'anello di Waldeyer (tonsille e adenoidi) e le placche del Peyer (la replicazione in questi siti è generalmente rilevabile entro 1-3 giorni). Di qui progredisce verso i linfonodi satelliti fino a provocare una diffusione ematica (prima viremia).

In alcuni casi, dopo un'ulteriore moltiplicazione nelle cellule fisse e mobili del sistema reticoloendoteliale, e una "seconda viremia" i virus possono arrivare ad organi-bersaglio (7) quali il sistema nervoso centrale (Figura 9). Un aspetto non ancora noto della patogenesi del poliovirus è la vulnerabilità selettiva dei motoneuroni all'infezione da tale virus.

In rapporto al diverso grado di risposta dell'ospite, di virulenza e carica infettante dei virus, il progredire dell'infezione si arresta nella maggior parte dei casi ai diversi livelli (mucoso, linfatico, ematico, ecc.) che precedono l'arrivo degli agenti virali agli organi-bersaglio. Ciò spiega come accanto a forme tipiche ve ne siano altre, più numerose, senza sintomatologia clinica o con sintomatologia lieve e non specifica.

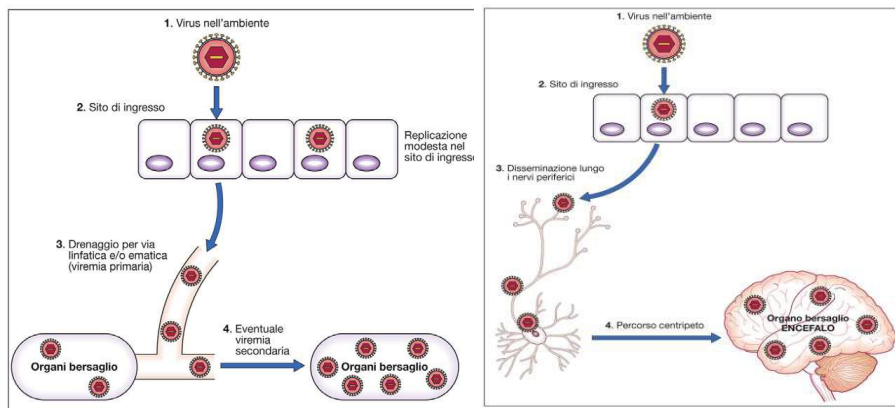


Figura 9. Infezione disseminata da poliovirus

Sono noti due meccanismi di infezione del sistema nervoso centrale. Il primo, che consiste nel passaggio del virus attraverso la barriera ematoencefalica (28), è avvalorato dal fatto che la malattia paralitica da poliovirus sia preceduta da una fase di “maggiore o seconda viremia” e che la presenza in circolo di anticorpi neutralizzanti possa prevenire la poliomielite (29). La maggior parte degli individui controlla l’infezione prima di questa fase, risultando in un’infezione asintomatica.

Sebbene la viremia sembra essere critica per l’ingresso del virus nel S.N.C., diversi studi dimostrano che i poliovirus sono anche in grado di utilizzare un’altra via, quella dei nervi periferici e craniali, presumibilmente tramite un flusso assonale retrogrado. L’importanza di quest’ultimo meccanismo è stata tragicamente dimostrata nell’incidente di Cutter (a Berkeley, California), avvenuto nel 1955. La somministrazione per via intramuscolare di vaccino anti-polio non completamente inattivato causò casi di malattia paralitica con interessamento iniziale della zona di iniezione (30). Inoltre è stato provato che c’è un maggior rischio di paralisi per i soggetti che ricevono iniezioni intramuscolari che interferiscono con l’infezione naturale da poliovirus (se la somministrazione avviene durante il periodo di incubazione) o con la vaccinazione orale con virus vivo e attenuato (31). Si presume che l’iniezione intramuscolare permetta al ceppo vaccino-derivato di penetrare nelle terminazioni dei nervi periferici e di diffondersi al midollo spinale mediante un flusso retrogrado assonale. Comunque è anche possibile che l’iniezione potenzi la viremia aumentando la permeabilità vascolare del muscolo al virus che può quindi raggiungere la regione del midollo spinale che innerva l’arto in cui è stata effettuata l’iniezione.

Analogamente, l’esecuzione di una tonsillectomia (durante il periodo di incubazione dell’infezione da poliovirus) è associata a casi più gravi di paralisi e ad una maggiore incidenza della poliomielite bulbare per l’ingresso del virus nell’encefalo mediante i nervi craniali.

Non è da escludere l’ipotesi che il flusso assonale possa essere utile in associazione con la viremia poiché quest’ultima permetterebbe al virus di raggiungere i muscoli dai quali, per via assonale, potrebbe invadere il sistema nervoso centrale (7).

Le lesioni che seguono l’infezione sono variabili da caso a caso. Si osserva più frequentemente il danneggiamento dei motoneuroni delle corna anteriori del midollo spinale, ma nei casi più gravi, possono essere interessati anche i gangli grigi intermedi, il corno posteriore e i gangli della catena dorsale, il talamo, l’ipotalamo, la formazione reticolare, i nuclei vestibolari, il verme del cervelletto ed i nuclei cerebellari profondi. Le lesioni della corteccia cerebrale sono generalmente confinate alla corteccia motoria lungo il giro precentrale. I neuroni vengono distrutti e fagocitati dalla microglia (neuronofagia); la reazione leucocitaria è presente solo per pochi giorni, ma le cellule mononucleari e la microglia persistono per vari mesi sottoforma di accumuli pervasali. La clinica dipende dalla gravità delle

lesioni piuttosto che dalla loro localizzazione, che è quasi sempre la medesima. La prima alterazione visibile consiste in una cromatolisi centrale delle cellule nervose associata ad una reazione infiammatoria (infiltrati locali e perivascolari).

Entrambe queste alterazioni sono accompagnate dalla moltiplicazione del virus all'interno del sistema nervoso centrale ed entrambe precedono di uno o più giorni l'esordio della paralisi. I motoneuroni infettati continuano nella loro funzione fino a quando non viene raggiunto un stadio di grave cromatolisi. Il danno si manifesta con paralisi flaccida nei gruppi muscolari innervati dai neuroni colpiti. Il grado di paralisi è strettamente correlato al numero dei motoneuroni distrutti: nei casi in cui gli arti rimangono atrofici e paralizzati, si trova che nei corrispondenti segmenti midollari è sopravvissuto meno del 10% dei neuroni. Tale paralisi può regredire in 4-6 settimane qualora i neuroni vadano incontro ad una temporanea perdita di funzionalità, senza processi distruttivi.

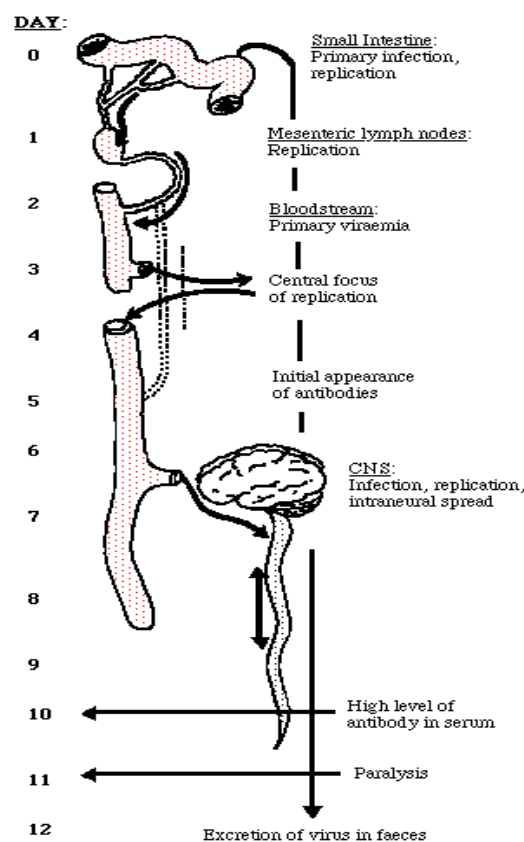


Figura 10. Patogenesi delle infezioni da poliovirus (Fonte: CDC)

2.1.8 Infezione e trasmissione virale

L'uomo rappresenta l'unico serbatoio naturale del virus della poliomielite, che può colpire persone di tutte le età ma principalmente si manifesta nei bambini sotto i tre anni.

Il periodo di incubazione varia da 3 a 35 giorni, con un arco più comune che va dai 6 ai 20 giorni (32).

Il contagio con i poliovirus avviene per via oro-fecale, attraverso l'ingestione di acqua o cibi contaminati o tramite la saliva e le goccioline emesse con i colpi di tosse e gli starnuti da soggetti ammalati o portatori sani. Le persone infette eliminano grandi quantità di particelle virali con le feci, dalle quali il

virus può essere trasmesso indirettamente o direttamente ad altre persone. Dopo l'infezione iniziale l'eliminazione delle particelle virali con le feci inizia pressoché contemporaneamente a quella orofaringea, ma dura più a lungo: 3-6 settimane per i soggetti immunocompetenti e per mesi o anni da parte dei soggetti immunocompromessi. La contagiosità è massima 7-10 giorni prima e dopo la comparsa dei sintomi.

Per quanto concerne la trasmissione interumana, essa avviene soprattutto da parte di soggetti nei quali l'infezione decorre in modo asintomatico o con sintomatologia aspecifica. In una tale situazione il virus si diffonde rapidamente in maniera silente nelle comunità in relazione sia alle condizioni igieniche ed ambientali sia ai livelli di educazione sanitaria della popolazione infettando centinaia di persone prima che emerga il primo caso di poliomielite paralitica. Per tale motivo secondo l'OMS un singolo caso confermato di paralisi poliomielitica rappresenta in realtà l'evidenza di un'epidemia (3).

Nei Paesi, dove le condizioni igienico-sanitarie sono scarse, le feci costituiscono il principale mezzo di trasmissione poiché è più alta la probabilità di inquinamento di acque superficiali e fognarie con conseguente contaminazione di possibili veicoli di trasmissione quali alimenti, come molluschi e vegetali, e acqua stessa. In questi Paesi l'infezione può colpire qualsiasi età, ma più frequentemente coinvolge i bambini di età inferiore ai 5 anni, dei quali il 50 % dei casi ha un'età inferiore a 3 anni (33). Paradossalmente il miglioramento delle condizioni igienico-sanitarie e socio-economiche in assenza di programmi vaccinali efficienti può coincidere con un aumento dei casi di poliomielite paralitica; infatti la ridotta esposizione al virus durante l'infanzia determina una maggiore suscettibilità all'infezione delle fasce di popolazione d'età superiore. Ciò è potenzialmente svantaggioso in quanto la frequenza della malattia paralitica aumenta con l'aumentare dell'età (34).

Una situazione analoga si verificava in epoca prevaccinale negli Stati Uniti e negli altri Paesi sviluppati quando la poliomielite paralitica colpiva soprattutto la classi medio-alte della popolazione. Nei Paesi con buone condizioni igieniche le secrezioni oro-faringee possono essere relativamente più importanti nella trasmissione dell'infezione (35).

Inoltre, durante i periodi epidemici, un importante vettore di trasmissione è rappresentato dalle mosche che possono trasportare feci infette sugli alimenti.

L'infezione da poliovirus si accompagna ad un movimento immunitario testimoniato dalla comparsa di anticorpi neutralizzanti che durano, con rare eccezioni, tutta la vita.

2.1.9 La risposta immunitaria

La risposta immunitaria dell'ospite è un fattore importante nel controllo della patogenesi virale, in quanto la sopravvivenza e la patogenicità del virus nell'ospite dipendono fortemente dalla sua capacità di evadere o resistere ai meccanismi protettivi dell'immunità.

Relativamente all'immunità innata, è stata dimostrata un'alta suscettibilità delle cellule murine, carenti nella segnalazione di interferone di tipo I, alla stimolazione del virus.

L'importanza di questa famiglia di citochine è evidenziata dal fatto che la proteina virale L sembra inibire in modo specifico la trascrizione dei geni per l'interferone di tipo I.

Inoltre quest'ultimo sembra avere anche un ruolo importante nel regolare l'esito dell'infezione da poliovirus nei topi transgenici per il recettore CD155.

L'infezione da virus poliomielitici comporta anche una risposta immunitaria specifica (che fa seguito sia alle forme clinicamente manifeste sia a quelle inapparenti), sia di tipo umorale (linfociti B) sia cellulo-mediata (linfociti T). Per quel che concerne l'immunità umorale, si ha la comparsa di anticorpi

neutralizzanti e fissanti il complemento che conferiscono immunità sierotipo-specifica (anche se è stata riscontrata una modesta cross-reazione tra il poliovirus di tipo 1 e quello di tipo 2 (36). I primi, a differenza degli anticorpi fissanti il complemento (37), compaiono pochi giorni dopo l'esposizione al virus e permangono probabilmente per tutta la vita. Sebbene i tre sierotipi del poliovirus condividano alcuni antigeni, essi sono caratterizzati principalmente da marcate differenze intertipiche. Come per i coxsackievirus e gli echovirus, gli epitopi responsabili dell'induzione di anticorpi neutralizzanti sono collocati sulle tre proteine strutturali VP₂, VP₃ e soprattutto VP₁.

Anche se gli anticorpi sono di primaria importanza nel controllo delle infezioni, la risposta immunitaria cellulo-mediata è comunque indotta. Ci sono molti modi con cui le cellule T possono portare alla protezione e all'immunità dall'infezione, ad esempio aiutando i linfociti B oppure, nel caso dei linfociti T citotossici, causando la lisi delle cellule infette o il rilascio di citochine. Sebbene la risposta cellulo-mediata sia importante nel caso dell'infezione da molti virus, è poco significativa nelle infezioni da poliovirus (e, più in generale, da enterovirus umani) in quanto debole. Questa bassa risposta, in accordo con alti titoli virali, indica che questi virus potrebbero avere delle strategie per limitarla. Una possibilità è che inibiscano l'espressione della classe di antigeni MHC I mediante la proteina virale 3A, la quale ha anche la funzione di impedire l'apoptosi cellulare. Tuttavia, le cellule T sono molto importanti nel controllo dell'infezione, poiché la loro completa deplezione conduce ad una crescita marcata dei titoli virali.

In alcuni casi, il danno tissutale e le malattie conseguenti all'infezione possono essere causati dalla risposta dell'ospite al virus, piuttosto che dal virus in sé.

Gli individui che sono esposti al virus, tramite infezione o tramite l'immunizzazione con il vaccino antipolio, sviluppano l'immunità. Anche i soggetti immunizzati o parzialmente immunizzati possono venire infettati dal poliovirus, senza svilupparne i sintomi, e trasmetterlo ad altri.

Negli individui immuni, gli anticorpi IgA contro il poliovirus sono presenti nelle tonsille e nel tratto gastrointestinale e sono in grado di bloccare la replicazione del virus mentre gli anticorpi IgG e IgM possono prevenire la diffusione del virus ai neuroni motori del sistema nervoso centrale (38). L'infezione o la vaccinazione con un sierotipo di poliovirus non fornisce immunità contro gli altri sierotipi e l'immunità completa richiede l'esposizione a ciascun sierotipo (38). I neonati da madri immuni hanno un'immunità passiva transitoria. Tuttavia, l'incidenza della malattia paralitica in neonati nati da madri con poliomielite in atto al momento del parto è pari al 40% (39).

2.1.10 Sopravvivenza del Poliovirus nell'ambiente e in laboratorio

L'uomo rappresenta la sola riserva animale di poliovirus, pertanto la loro presenza nell'ambiente è la diretta conseguenza di infezioni recenti nella comunità umana. La contaminazione del suolo con poliovirus si verifica attraverso la fecalizzazione degli ambienti vicino alle abitazioni, la fertilizzazione delle messi con contenuti fognari o con acque reflue non adeguatamente trattate, e con le acque di scarico riciclate per l'irrigazione. I poliovirus nelle acque reflue riflettono la prevalenza dell'infezione nella comunità. La contaminazione delle acque superficiali può avvenire attraverso la discarica di acque reflue non trattate o inadeguatamente trattate o percolate attraverso suolo contaminato. La velocità di inattivazione virale in natura è fortemente influenzata dalle condizioni ambientali. L'infettività dei poliovirus nel suolo decresce del 90% ogni 20 giorni in inverno ed ogni 1,5 giorni in estate. Una simile riduzione del 90% a temperatura ambiente avviene ogni 26 giorni nelle acque reflue, ogni 5,5 giorni nell'acqua potabile ed ogni 2,5 giorni nell'acqua di mare.

I poliovirus, mancando di rivestimento, sono resistenti all'essiccamento, all'inattivazione tramite i comuni disinfettanti di laboratorio come alcool e cresoli e a condizioni estreme di Ph (stomaco) e di temperatura e possono persistere per giorni a temperatura ambiente. Sono prontamente inattivati da soluzioni diluite di formaldeide o cloro libero residuo, raggi ultravioletti, calore ed essiccamento. L'inattivazione può essere rallentata dalla contemporanea presenza di materia organica. In condizioni di laboratorio, il virus contenuto in campioni clinici o ambientali può sopravvivere per molti anni alle temperature di congelamento, per molti mesi in condizioni di refrigerazione, e per alcuni giorni a temperatura ambiente. Il virus è rapidamente distrutto dall'esposizione a temperature di 50°C o più, dall'autoclavaggio o dall'incenerimento (40).

2.2 LA POLIOMIELITE

2.2.1 Definizione

La poliomielite, detta spesso polio, è una malattia acuta virale altamente contagiosa, causata dall'infezione con uno qualsiasi dei tre sierotipi del poliovirus, che sono in grado di colonizzare il tratto gastrointestinale (41) specificamente l'orofaringe e l'intestino, e in alcuni casi di raggiungere il sistema nervoso centrale. Il termine deriva dal greco *poliós* (πολιός) che significa "grigio", *myelós* (μυελός) che si riferisce al midollo spinale, e il suffisso *-itis*, che indica l'infiammazione. La sintomatologia caratteristica è una paralisi flaccida ad insorgenza acuta, a carico degli arti o del tronco, causata dalla distruzione da parte del virus dei motoneuroni presenti nelle corna anteriori del midollo spinale. Questa patologia colpisce soprattutto i bambini sotto i cinque anni di età e 1 infezione su 200 provoca una paralisi irreversibile, di solito agli arti inferiori, e tra coloro che rimangono paralizzati il 5-10% muore a causa della paralisi dei muscoli respiratori.

2.2.2 Cenni storici

Le deformazioni ossee osservate in reperti scheletrici databili al 3700 a.C. confermerebbero con buona approssimazione che la poliomielite sia esistita fin dai tempi più antichi. Questa ipotesi sarebbe avvalorata dal ritrovamento di una stele egizia della XVIII dinastia, conservata oggi alla Gliptoteca Calsberg di Copenaghen e databile tra il 1580 e il 1350 a. C., raffigurante un personaggio identificato nel sacerdote Rouma che si appoggia a un bastone ed ha la gamba destra atrofica e accorciata con il piede in posizione equina, tipico esito della poliomielite.

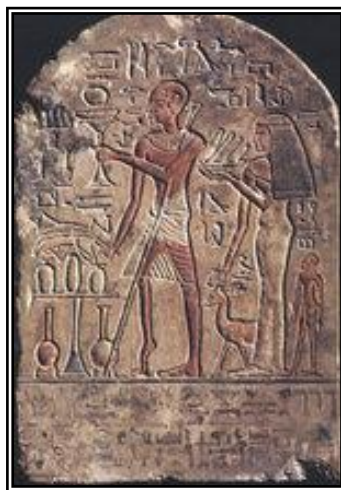


Figura 11. Stele egizia

Alcune pagine del "Corpus ippocraticum" fanno pensare che in epoca greco-romana tale malattia avesse carattere endemico. È stato ipotizzato che anche l'imperatore romano Claudio da bambino fosse stato colpito da poliomielite e che ciò lo abbia poi costretto a camminare zoppicando per tutto il resto della sua vita.

2.2.2.1 *Le prime descrizioni*

La poliomielite viene descritta per la prima volta come entità nosologica distinta nel 1789 dal fisico inglese Michael Underwood, che però la definì solamente come una "debolezza degli arti inferiori". Pur non evidenziandone il carattere epidemico, la descrisse come malattia che insorgeva dopo una febbre associata a diarrea, che riguardava l'infanzia, in quanto venivano colpiti soprattutto i lattanti nel periodo della dentizione, e in cui la comparsa della paralisi seguiva l'episodio febbrile. Dopo questa prima osservazione solo nel 1813 si ha un'ulteriore descrizione da parte di un medico italiano, Giovanni Battista Monteggia che la definisce con i termini di "paralisi e atrofia"; viene infatti evidenziata per la prima volta l'atrofia degli arti come esito della malattia, che insorgeva dopo una febbre in bimbi precedentemente sani.

Nel 1840, data che rappresenta la pietra miliare nella storia della poliomielite, il tedesco Jacob Heine evidenziò per primo la contagiosità della malattia segnalando un'epidemia in Germania di quattordici casi, dei quali descrisse la precisa sequenza di eventi clinici che avevano preceduto la paralisi, differenziando la paralisi flaccida, esito della poliomielite, dalla paralisi spastica di Little e affermando, per primo, che la poliomielite era la conseguenza di una lesione del midollo spinale, da cui il titolo di paralisi spinale infantile che diede alla seconda edizione del suo libro, nel 1860. Le descrizioni che J. von Heine, insieme con il suo allievo K. O. Medin, hanno dato della malattia sono così dettagliate e importanti al punto che la poliomielite viene indicata anche come malattia di Heine-Medin.

Charcot, nel 1870, per primo affermò che il danno della paralisi acuta spinale dell'infanzia era localizzabile primitivamente nelle cellule nervose delle corna anteriori del midollo spinale, inquadrando nosologicamente la malattia tra le mieliti.

E' sorprendente dover constatare che fino a tutto il XIX secolo la poliomielite non fosse ancora classificata fra le malattie sicuramente infettive, malgrado la sua epidemicità.

Solo nel 1907 Wickman, un pediatra svedese, in occasione di un'epidemia avvenuta in Scandinavia tra il 1903 e il 1906, riconobbe e affermò per primo il carattere infettivo della malattia, l'esistenza di portatori sani e la possibilità che questi potessero diffondere l'infezione e catalogò le diverse tipologie cliniche della poliomielite. Altre epidemie si erano verificate in Germania nel 1898, in Australia nel 1895, negli USA nel 1896, 1897, 1901, con un crescendo impressionante. A causa dell'elevato numero dei portatori sani le misure generali di igiene non si erano dimostrate sufficienti a controllare la malattia. Ma intanto la ricerca scientifica compiva ulteriori passi in avanti. Dal 1909 al 1911 Landsteiner e Levaditi dimostrarono che l'agente eziologico della poliomielite era un'entità ultrafiltrabile come gli agenti del vaiolo e della rabbia. Inoculando per via nasale alla scimmia (*Macacus rhesus*) sangue infetto, essi riprodussero la malattia che assunse un decorso simile a quello dell'uomo, concludendo per la sua natura virale. Era maturata la constatazione che l'infezione quando si concludeva in modo favorevole era seguita da un'immunità di lunga durata perché in successive epidemie quei pazienti non si ammalavano più. Esperimenti condotti su scimmie confermarono questa convinzione. L'unica via da seguire era perciò quella della immunizzazione attiva attraverso un vaccino.

2.2.2.2 *Le prime epidemie*

La poliomielite è stata per lungo tempo endemica e a partire dalla fine del Settecento la malattia assunse un carattere epidemico sempre più ingravescente a partire dalla seconda metà dell'Ottocento. Nello stesso periodo è diventata sempre meno una malattia infantile, colpendo invece sempre più adolescenti e adulti, al punto che, nell'arco di appena un centennio, si è registrato uno spostamento in

avanti dell'età maggiormente colpita; questo fatto è stato descritto come il “paradosso della poliomielite”. Secondo alcune ipotesi il generale miglioramento igienico e sanitario delle condizioni di vita ha comportato una diminuita probabilità di contrarre l'infezione nella primissima infanzia e un progressivo innalzamento dell'età al primo contatto con i tre ceppi del virus, causando epidemie progressivamente più importanti.

La prima descrizione di un'epidemia di poliomielite fu fatta dall'inglese J. Bradham che riportò quattro casi di paralisi verificatisi vicino a Sheffield tra il 1834 e il 1835, ma senza che ne sospettasse la natura contagiosa. Esistono anche altre descrizioni di piccole epidemie di paralisi infantile in Svezia, in Norvegia e in Francia, dove Cordier nel 1888 descrisse venticinque casi verificatisi nel villaggio di Sainte-Foy-l'Argentiere, vicino Lione nel periodo fra giugno e luglio 1885, ipotizzandone il carattere infettivo o contagioso. Secondo Ivar Wickman, il primo a parlare di epidemia fu nel 1881 lo svedese Bergenholtz, che pubblicò, nei rapporti di salute pubblica del suo paese, una serie di diciotto casi verificatisi nel Nord della Svezia. Altre epidemie si verificarono in Germania nel 1898, in Australia nel 1895, negli Stati Uniti nel 1896, 1897, 1901, con un crescendo impressionante.

Al X Congresso medico internazionale di Berlino del 1890 lo svedese Medin presentò i dati dell'epidemicità della malattia con la documentazione di 44 casi diagnosticati a Stoccolma.

Secondo uno studio della Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS), pubblicato nel 1955 che comparava l'estensione dell'infezione poliomielitica negli anni Venti del XX Secolo in una serie di Paesi, i virus della poliomielite si dimostrarono diffusi in tutto il mondo specie nei paesi industrializzati, dove nel periodo tra il 1920 e il 1953, con punte di massima incidenza nei paesi nordici, si riscontrarono livelli tali da raggiungere tra i 30 e i 58 casi per anno per ogni 100.000 abitanti (42).

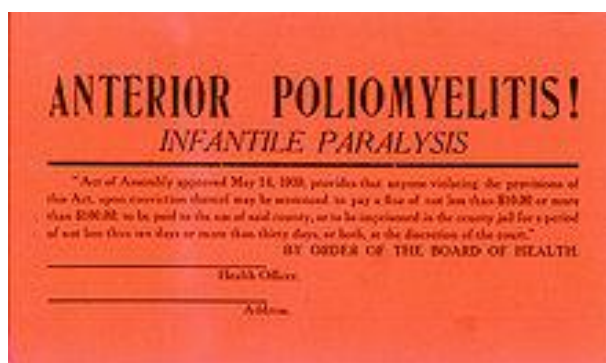


Figura 12. Avviso affisso alle finestre delle case dove vi erano affetti da poliomielite in quarantena. Inizi del XX secolo (Fonte: www.wikipedia.org)

Dal 1951 al 1955 la poliomielite paralizzava circa 28.500 bambini ogni anno nei Paesi della Regione Europea. Numerose epidemie sono state segnalate in questi anni nei Paesi della Regione Europea, tra cui: nel 1952 in Danimarca con 2.450 casi; nel 1957 in Francia con 4.019 casi; nel 1958 in Italia con 8.377 casi; nel 1950 in Inghilterra con 5.565 casi; e nel 1953 e nel 1962 in Svezia con 5.090 e 57.879 casi rispettivamente.

Dopo l'introduzione della vaccinazione negli anni '50, la malattia subì una drastica riduzione del numero di casi in tutto il mondo.



Figura 13. Assistenza respiratoria tramite i polmoni d'acciaio

2.2.2.3 Lo sviluppo del vaccino

Data la diffusione e le sue dimensioni epidemiche la malattia divenne sempre più un problema di carattere e interesse sociale. L'opinione pubblica fu sensibilizzata alla raccolta di fondi, che si rivelarono indispensabili per lo sviluppo della ricerca sulla poliomielite e soprattutto per la realizzazione del vaccino. Immensi sforzi filantropici vennero condotti in diversi Paesi nel corso degli anni. In particolare Stati Uniti, anche per una maggiore sensibilizzazione dovuta al fatto che lo stesso presidente Franklin Delano Roosevelt ne era stato colpito nel 1921 riportando una paraplegia, venne iniziata una raccolta di fondi, la famosa "March of dimes" (ovvero la marcia delle monetine d'argento da 10 centesimi di dollaro) che servì a sovvenzionare la istituzione nel 1937 della National Foundation for Infantile Paralysis, finalizzata alla ricerca di un vaccino antipoliomielitico. Un forte impegno filantropico e finanziario si ebbe anche in Europa, con la nascita di Fondazioni o con l'elargizione di somme come successe in Svezia quando nel 1939 Gustavo V di Svezia destinò tutti i fondi, raccolti per beneficenza, secondo tradizione nel giorno del genetliaco reale, alla ricerca e alla cura di malattie disabilitanti e in primo luogo alla poliomielite (43).

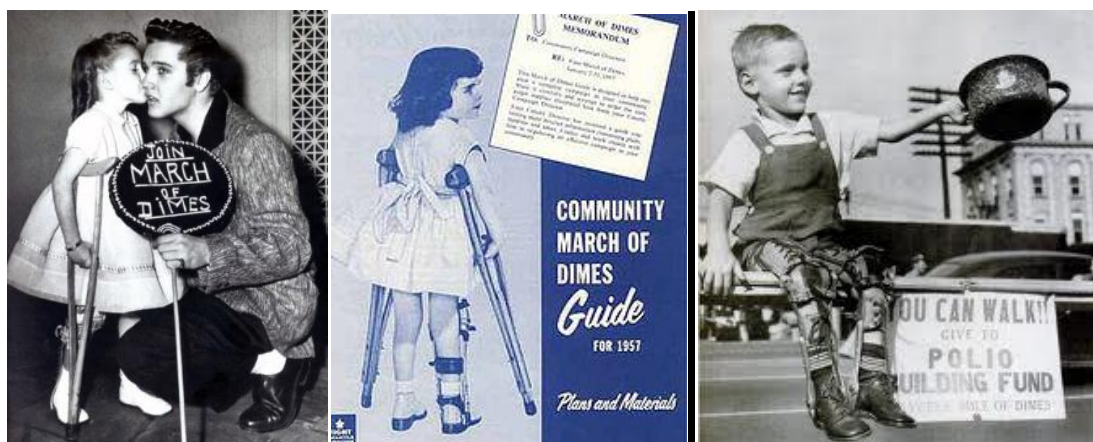


Figura 14. Iniziativa "March of dimes" (Fonte: www.wikipedia.org)

I primi tentativi di ottenere un vaccino furono compiuti da Thomsen in Danimarca nel 1913-14; seguirono poi S.Flexner e H.Amoss, a distanza di dieci anni. In tale periodo diversi ricercatori, fra cui S.Flexner e Levaditi C., tentarono di inattivare l'agente patogeno mediante il calore o mezzi chimici, con risultati non soddisfacenti. Nel 1931, un ricercatore canadese, Maurice Brodie, con il suo collaboratore W. Park, del *New York City Department of Health*, annunciò di essere riuscito a immunizzare scimmie di laboratorio con un vaccino inattivato con formaldeide e di averlo utilizzato anche in un gruppo di bambini provandone l'innocuità. Brodie asserì che dopo una o due dosi del suo vaccino nel sangue di tali bambini comparivano anticorpi neutralizzanti. La sperimentazione fu ampliata sino a vaccinare 3000 soggetti. Anche John Kolmer, ricercatore americano della *Temple University* di Filadelfia, quasi contemporaneamente a Brodie, allestì un vaccino basato su virus vivo ma attenuato, derisoriamente chiamato in seguito "una vera pozione stregata", e affermò di averlo usato su migliaia di bambini.

Molti autori, scettici sul modo con cui Brodie e Kolmer avevano inattivato o attenuato il virus, analizzando i dati che i due avevano diffuso, arrivarono alla conclusione che erano stati gli stessi vaccini usati a provocare i casi di poliomielite senza che nei vaccinati si avesse una prioritaria risposta del sistema immunitario, che è quella che consente di acquisire l'immunità verso la malattia e non la malattia stessa. Di conseguenza i due vaccini proposti furono bocciati dalle commissioni internazionali e come conseguenza vennero interrotti tutte le ricerche tese alla prevenzione della malattia e lo stesso Brodie, che come si vide in seguito partiva da premesse scientificamente corrette, si tolse la vita (43).

Dopo gli insuccessi di Brodie e Kolmer ci vollero 15 anni per riprendere la sperimentazione, con esperimenti molto controllati, di un vaccino antipoliomielitico, che effettivamente aprisse la strada per la prevenzione della malattia, anche se l'ambiente scientifico era molto titubante e scettico a tal proposito. Nel 1941 A. Sabin e R. Ward avevano precisato le modalità di penetrazione del virus nell'organismo umano dimostrando la sua presenza nel tubo digerente e, nello stesso anno, H. Howe e D. Bodian avevano confermato tale affermazione riuscendo a trasmettere per via orale la malattia allo scimpanzé.

Verso la fine degli anni '40 si fecero importanti scoperte come l'identificazione, da parte di diversi gruppi di ricercatori, indipendentemente l'uno dall'altro, dei tre distinti tipi di poliovirus, rispettivamente indicati come: Tipo I Brunhilde, Tipo II Lansing, Tipo III Leon, una distinzione microbiologica che si rivelò essenziale per lo sviluppo di un vaccino efficace. Nel 1949, ad Harvard, John Franklin Enders, Thomas Huckle Weller e Frederick Chapman Robbins, poi insigniti nel 1954 del Premio Nobel proprio per tale scoperta, misero a punto il metodo per far crescere in colture cellulari i virus, in particolare proprio i poliovirus, e grazie alle osservazioni condotte sulle colture cellulari infettate di tessuto di rene di scimmia, descrissero le lesioni osservate senza far ricorso ad animali da esperimento come le scimmie (44).

E' intorno al 1950 che viene costituito, per iniziativa della National Foundation for Infantile Paralysis, un comitato per la vaccinazione antipoliomielitica, di cui facevano parte Albert Sabin e Jonas Edward Salk. Salk, professore di virologia nell'Università di Pittsburg, che nel corso della Seconda Guerra Mondiale aveva partecipato al programma della Commissione per l'Influenza del Comitato Epidemiologico dell'esercito americano, appariva come persona ideale per condurre un programma per lo sviluppo di un vaccino per la poliomielite. Dal 1950 fu sovvenzionato dalla stessa National Foundation for Infantile Paralysis per condurre ulteriori ricerche sul vaccino antipoliomielitico, che portarono al primo efficace risultato.

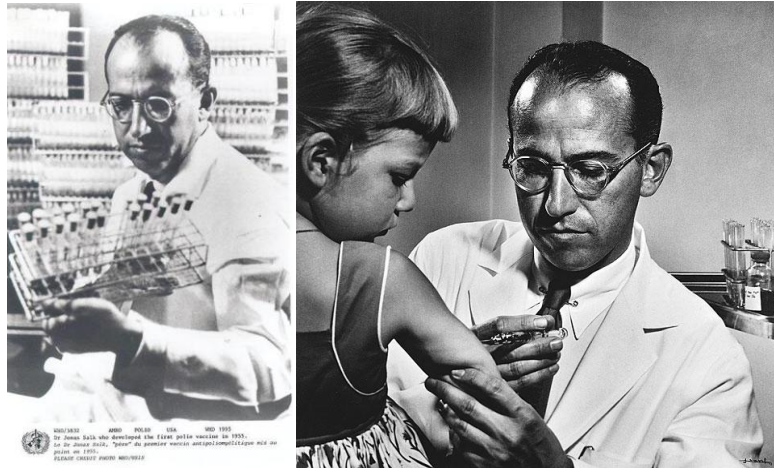


Figura 15. Jonas Salk, ideatore del vaccino a iniezione (IPV)
 (Fonti: www.the-scientist.com-www.xtimeline.com)

Salk riprese le idee di Brodie ma si orientò verso un vaccino con virus completamente ucciso; egli riuscì a realizzare un vaccino efficace per i tre tipi di virus identificati, vaccino non tossico, inattivato al formolo, utilizzando cellule renali di scimmia come mezzo di coltura del virus e un'emulsione di olio minerale. All'inizio del 1953 Salk diede inizio ad una intensa campagna sperimentale del suo vaccino e il 26 aprile 1954 poté somministrarne la prima dose ad un bambino di sei anni, di nome Rody Kerr, di Mc Lean, nello Stato della Virginia.



Figura 16. Il successo del vaccino IPV
 (Fonti: www.wikipedia.org-www.researchhistory.org)

Nel 1954, dopo accesi dibattiti, avviò uno studio su un grande numero di soggetti per raggiungere prove inconfutabili circa l'innocuità del vaccino e la sua efficacia protettiva. Vennero coinvolti i laboratori Connaughts del Canada e quelli di diverse industrie farmaceutiche. Lo studio riguardò oltre 1.800.000 bambini. I risultati conseguiti e l'annuncio trionfale della efficacia del vaccino furono presentati alla Michigan State University a Ann Arbor il 12 Aprile del 1955, ma appena quindici giorni dopo si diffuse la notizia che cinque bambini della California vaccinati nel corso dello studio erano rimasti paralizzati dopo

avere ricevuto il vaccino antipoliomielitico iniettato per via intramuscolare. In ciascun caso la paralisi si era verificata nel braccio che era stato inoculato e in ciascun caso il vaccino era stato prodotto dai Laboratori Cutter. L'incidente era dovuto ad errore tecnico nella preparazione di un lotto di vaccino, che conteneva un virus non del tutto inattivato che aveva causato la poliomielite e a un controllo insufficiente sulla preparazione del vaccino stesso. A questo triste episodio venne dato il nome di "incidente di Cutter", dal nome della casa farmaceutica Cutter di Berkeley in California, che aveva rifornito di vaccino una zona territorialmente circoscritta da cui appunto provenivano tutti i casi di poliomielite secondaria a vaccinazione. Il vaccino Cutter fu immediatamente ritirato, ma 380 dosi erano già state somministrate. L'episodio ebbe dimensioni limitate, causò 204 casi di poliomielite da vaccino, di questi 79 erano bambini direttamente vaccinati, i restanti erano familiari contagiati dal virus diffuso dai bambini. Vi furono 11 morti (43). L'incidente di Cutter ebbe effetto fortemente negativo, ma la campagna di vaccinazione non fu sospesa negli Stati Uniti. Furono somministrate oltre quattro milioni di dosi e la malattia che aveva, sino ad allora mostrato un andamento in forte crescita, per cui in vent'anni i casi erano quadruplicati, in poco tempo, si ridusse di un quinto a motivo della vaccinazione, tanto che nel 1961 i casi di malattia denunciati erano un ventesimo rispetto a quelli degli anni precedenti (44).

Il vaccino si diffuse rapidamente in molti Paesi. In Italia, che, peraltro non era tra i paesi maggiormente colpiti dall'infezione, il vaccino Salk fu introdotto per la prima volta nel 1957.

Il vaccino inattivato iniettabile Salk, pur conferendo un'immunità individuale, non impediva al virus di continuare a persistere nell'ambiente e a essere trasmesso con le feci dai portatori sani, perché, data la sua natura, non c'era nessuna possibilità che un virus ucciso e iniettato potesse andare a competere a livello ambientale col virus selvaggio. Per questo motivo continuarono le ricerche per la messa a punto di un vaccino orale costituito da virus vivi e attenuati che, riproducendosi nell'intestino dei soggetti vaccinati, ma non nelle cellule del midollo spinale (e quindi non provocasse paralisi), avrebbe fornito loro un elevato numero di anticorpi contro l'infezione e, nello stesso tempo, avrebbe consentito una profilassi a livello ecologico attraverso la diffusione nell'ambiente del virus "benigno". Koprowski, Sabin e Cox, in modo indipendente l'uno dall'altro, approfondirono le loro ricerche al fine di ottenere un vaccino sicuro.

Già nel 1951 Hilary Koprowski, che negli anni '40 aveva lavorato per la casa farmaceutica Lederle, aveva annunciato di avere ottenuto un virus altamente attenuato somministrabile per via orale, capace di moltiplicarsi a livello intestinale e di indurre una protezione verso l'infezione stessa. Lo stesso risultato fu ottenuto dal batteriologo americano H. R. Cox, che aveva cooperato con la Koprowski nei laboratori della Lederle.

Nel 1955 Albert Bruce Sabin, polacco naturalizzato statunitense, direttore del *Children's Hospital Research Foundation* dell'Università di Cincinnati, riuscì ad ottenere un vaccino trivalente attenuato efficace per via orale, capace di spiazzare i virus patogeni sostituendosi ad essi. Sperimentò il suo vaccino dapprima su se stesso, sul suo collaboratore messicano Alvarez e sul tecnico Hugh Hardy, e poi, su vasta scala, ne dimostrò l'efficacia in una campagna di vaccinazione di massa nel Chiapas, in Messico. Dette il ceppo anche ai virologi di Leningrado per consentire all'Unione Sovietica di avviare un ampio studio sul vaccino antipoliomielitico. Facendo parte del Comitato di esperti che l'OMS istituì nel 1957 allo scopo di formulare vaccini vivi attenuati, Sabin ebbe buon gioco nel far accettare il suo vaccino orale ma non brevettò mai il risultato delle sue ricerche facendone dono a tutti i paesi intenzionati ad utilizzare il suo vaccino.



Figura 17. Albert Bruce Sabin, ideatore del vaccino orale contro la polio (OPV)
(Fonte: www.wired.com - amhistory.si.edu)

Il vaccino antipoliomielitico Sabin cominciò ad essere preparato negli USA dal 1961, quando ormai era una realtà nota nel mondo, e solo nel 1964 si giunse negli USA alla vaccinazione di massa con questo tipo di vaccino. Nello stesso anno venne adottato anche in Italia, dove la vaccinazione diventò obbligatoria per legge nel 1966 per tutti i nuovi nati.

Con l'uso del vaccino tipo *Sabin* c'era la possibilità di eliminare con le feci un virus vivo attenuato, con lo scopo di mettere in circolo una popolazione virale a bassa virulenza in modo da poter ottenere un'elevata copertura vaccinale di massa, anche nei confronti degli individui che per svariati motivi non erano stati vaccinati (ad esempio gli immigrati).

Il vaccino di Sabin, somministrato fino ad anni recenti anche in Italia, ha permesso di eradicare la poliomielite in Europa ed è raccomandato dall'Organizzazione mondiale della sanità nella sua campagna di eradicazione della malattia a livello mondiale. Purtroppo in rarissimi casi l'assunzione del vaccino OPV era associata alla comparsa di paralisi.

Durante il periodo da 1973 al 1984 negli USA si sono avuti 138 casi di poliomielite paralitica e che il 76% di questi casi era dovuto al vaccino orale Sabin. Ciò era la conseguenza della comparsa di ceppi mutanti tra la prole dei ceppi vaccinici somministrati oralmente e riproducendosi nell'intestino, ceppi mutanti che manifestavano evidentemente un rilevante aumento della loro virulenza, provocando gli stessi effetti del virus selvaggio. Nel 1982-83 tutti i 21 casi di poliomielite riscontrati negli USA sono stati addebitati al vaccino OPV. L'incidenza complessiva dei casi di paralisi poliomielitica conseguenti al vaccino è stata valutata di un caso su 2,6 milioni di dosi somministrate, mentre sale a 1 caso su 520.000 dosi somministrate il rischio associato alla prima vaccinazione e scende a 1 solo caso ogni 12,3 milioni di dosi successivamente somministrate.

Quando il rischio di comparsa di Poliomielite Paralitica Associata al Vaccino (VAPP), cioè causata dal vaccino stesso, è stato superiore al rischio di comparsa della malattia da virus selvaggio, è stato tassativo modificare il sistema di profilassi sostituendo l'OPV con l'IPV; per questo si decise di reintrodurre il vaccino tipo Salk.

2.2.3 Aspetti epidemiologici

Le infezioni e le malattie provocate dai poliovirus sono state presenti in tutte le epoche e in tutti i paesi del mondo.

In epoca prevaccinale estese indagini epidemiologiche avevano dimostrato che la circolazione dei virus poliomielitici era in rapporto:

- alla latitudine, risultando più rapida dai Poli verso l'Equatore (con andamento endemo-sporadico nelle regioni tropicali);
- alla stagione nelle zone temperate, risultando maggiore in primavera ed estate, periodi in cui si registravano più frequentemente epidemie;
- ai fattori ambientali, quali le condizioni igienico-sanitarie e socio-economiche, risultando intensa nelle aree depresse.

La *malattia paralitica*, invece, presentava un fenomeno apparentemente paradossale: la sua incidenza era più alta nei Paesi a livello igienico-sanitario elevato rispetto a quelli con basso livello; nei primi, inoltre, la poliomielite tendeva sempre più evidentemente ad uscire dai suoi limiti tradizionali di paralisi infantile per interessare percentuali crescenti di adolescenti e di adulti.

Estese ed accurate indagini epidemiologiche avevano reso chiari i motivi del fenomeno.

L'infezione da poliovirus determina un'immunità duratura; laddove la sua circolazione era rapida e diffusa, cioè nei Paesi a basso livello igienico, praticamente tutte le donne in età feconda risultavano immuni e durante la gravidanza trasmettevano anticorpi (IgG) per via placentare al prodotto del concepimento, capaci di proteggere i nuovi nati nei primi 6 mesi di vita. Se, come accadeva frequentemente, i bambini si infettavano entro tale periodo, il rischio di malattia era nullo (con decorso clinico molto modesto se non assente), perché l'immunità attiva si sovrapponeva senza soluzioni di continuità a quella passiva. Tale evenienza si verificava, al contrario, sempre meno frequentemente quando i livelli di educazione sanitaria e di igiene ambientale diventavano più alti: nelle regioni ad alto livello socio-economico l'esposizione era ritardata e la malattia tendeva ad interessare quote crescenti di adolescenti e di adulti, quando le possibilità di forme cliniche paralitiche aumentavano.

2.2.4 Sintomatologia e patologia

Tutti e tre i poliovirus sono estremamente virulenti e producono gli stessi sintomi della malattia (45). Il Poliovirus 1 è la forma che si riscontra più frequente e quella più strettamente correlata alla paralisi (46). La paralisi è la manifestazione più evidente dell'infezione, ma solo una minima percentuale degli infetti presenta questo quadro clinico.

Infatti circa il 92% delle persone infettate non manifestano alcun sintomo, anche se continuano per un certo tempo ad eliminare il virus attraverso le feci trasmettendolo ad altre persone. In questo caso l'infezione viene definita inapparente o asintomatica. Circa il 6% delle infezioni risultano in una malattia minore o non specifica con sintomi simil-influenzali e disturbi gastrointestinali. Non c'è un coinvolgimento del sistema nervoso centrale e la malattia risulta indistinguibile dalle altre infezioni virali, ed è nota come "poliomielite abortiva". Nell'1,5% dei casi si può sviluppare la meningite asettica non paralitica che nel giro di pochi giorni è seguita da completo recupero. Lo 0,5% delle infezioni coinvolge il sistema nervoso centrale provocando una paralisi flaccida acuta con atrofia muscolare. In questo caso la malattia si manifesta come poliomielite paralitica più o meno grave, a volte con recupero quasi completo.

Esito	Percentuale dei casi
Asintomatico	92%
Disturbi minori	6%
Meningite non paralitica asettica	1,5%
Poliomielite paralitica	0.5%
— Poliomielite spinale	79% dei casi paralizzanti
— Poliomielite bulbospinale	19% dei casi paralizzanti
— Poliomielite bulbare	2% dei casi paralizzanti

Tabella 3 . Esiti dell'infezione da poliovirus (32)

Non sono chiari i motivi che portano un individuo a sviluppare la forma più grave di polio, la paralisi, ma tra i fattori di rischio che giocano un ruolo chiave nell'aumentare la probabilità di sviluppare la paralisi in una persona infettata dal poliovirus l'OMS cita:

- *immunodeficienza;*
- *età:* la frequenza di paralisi aumenta con l'aumentare dell'età, motivo per cui è meno diffusa nei Paesi meno sviluppati in cui la prima infezione si verifica in età precoce;
- *gravidanza;*
- *tonsillectomia (rimozione delle tonsille)* è associata ad un rischio maggiore di interessamento bulbare;
- *iniezioni intramuscolari* somministrate durante il periodo di incubazione o nella fase prodromica della malattia;
- *esercizio fisico vigoroso e/o esagerato* nel periodo prodromico può predisporre alla paralisi;
- *ferite, traumi o interventi chirurgici* possono provocare la paralisi delle estremità interessate (47) (3).

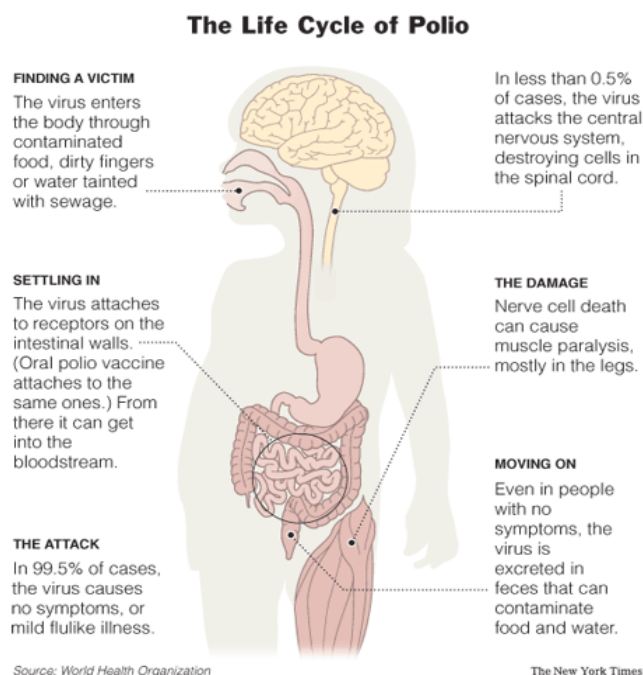


Figura 18. La circolazione del poliovirus nell'organismo (Fonte: www.njpolio.org)

Una minima parte delle infezioni, circa una su duecento secondo i dati OMS, porta a una paralisi irreversibile, in particolare in 1 su 1.000 bambini infetti e 1 su 80 giovani adulti infetti. In talune circostanze i virus poliomielitici possono causare anche paralisi respiratorie rendendo così impossibile la respirazione autonoma e provocando morte. Circa il 5-10% dei malati muore a causa della paralisi dei muscoli dell'apparato respiratorio [epicento]. Il numero di decessi è del 2-5% nei bambini ed oltre il 15-30% negli adulti; la pericolosità dell'infezione aumenta con l'età in cui si ha il primo contatto col virus. La mortalità arriva al 25-75% se si verifica un coinvolgimento bulbare. Inoltre sono possibili ricadute dopo 30-40 anni con dolori muscolari e progressivo indebolimento e in questo caso si parla di sindrome post-polio (paragrafo post-polio).

2.2.4.1 **Caratteristiche cliniche**

Il quadro clinico varia a seconda del livello al quale l'infezione si arresta nella cellula-ospite (mucoso, linfatico, ematico, meningeo e nervoso) (7) (48).

Infezione inapparente (95%), senza sintomi o con sintomatologia di scarsissima rilevanza clinica.

Poliomielite abortiva o malattia minore (4,8%), è la forma non differenziata e più comune della malattia che si manifesta dopo un periodo di incubazione di 1-3 giorni. È caratterizzata da sintomi aspecifici quali febbre, malessere, sonnolenza, cefalea, mialgie, a volte con modici segni di enterite (nausea, vomito, costipazione) o di faringite (mal di gola) in varie combinazioni. Il paziente si riprende in pochi giorni. Tale forma è definita anche come "malattia minore estiva", perché è sul finire dell'estate che si manifesta più frequentemente. In una minoranza dei casi, la malattia non si arresta: dopo un intervallo asintomatico di 2-7 giorni, ricompare improvvisamente la febbre e si manifesta una sindrome meningea (8).

Poliomielite non paralitica o "meningite asettica" (meningite a liquor limpido), è una manifestazione febbrile con interessamento meningeo che si ha in una minoranza di casi (1-2%). Si presenta con sintomi clinici tipici delle meningiti sostenute da altri agenti virali, quali febbre, cefalea, rigidità nucale e

rachidea, torpore psichico e segni di irritazione meningea. Ha decorso breve (da 2 a 10 giorni) e prognosi favorevole, caratterizzata da una guarigione rapida e completa in 5-10 giorni. L'interessamento del sistema nervoso centrale evolve più frequentemente e rapidamente verso la fase paralitica (piuttosto che verso la meningite asettica), che può presentarsi all'improvviso senza sintomi prodromici.

Poliomielite paralitica (malattia maggiore), può essere preceduta, nell'arco di 24-48 ore, da una sintomatologia aspecifica quale cefalea, iperestesia, dolore o spasmi muscolari che riflettono la replicazione del virus in questo. La polio-paralisi è di tipo flaccido, in quanto comporta la perdita del tono e della massa del muscolo colpito che, appare così più piccolo del normale, floscio e senza vita, abitualmente asimmetrica (cioè non colpisce in modo analogo tutti i muscoli: spesso risparmia quelli di un lato) e non contigua (a distribuzione irregolare) (49). Il tono muscolare appare quindi diminuito o abolito, la mobilizzazione passiva suscita vivo dolore, i riflessi osteotendinei sono assenti, mentre le sensibilità tattile, termica e dolorifica è sempre conservata. Tipici i disturbi vasomotori caratterizzati da ipotermia (8). L'entità della paralisi varia da caso a caso, a seconda della muscolatura colpita. Più frequentemente sono interessati gli arti inferiori, ma possono anche essere implicate le braccia, i muscoli addominali, il cui interessamento può condurre alla paraplegia, e i muscoli toracici e respiratori, quali il diaframma e i muscoli intercostali, da cui può insorgere insufficienza respiratoria grave, che costituisce la più frequente causa di morte.

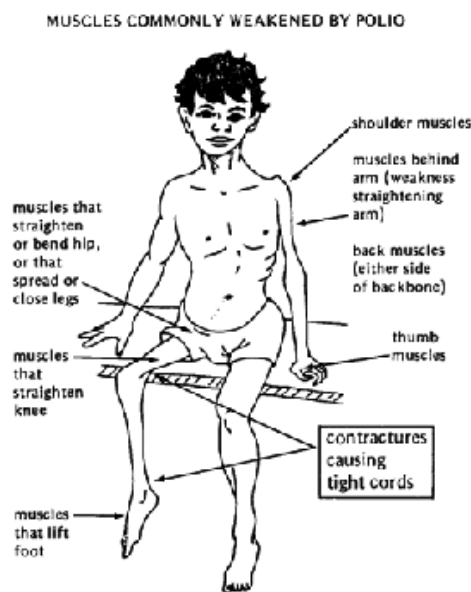


Figura 19. Muscoli colpiti dalla polio (Fonte: DINF web site)

2.2.4.1.1 Le forme di poliomielite paralitica

Le forme di polio-paralisi sono distinte in tre tipi in base al livello di coinvolgimento:

Forma spinale: è la forma più comune. La paralisi può insorgere senza uno stadio prodromico oppure avere un andamento bifasico. In quest'ultimo caso, la prima parte corrisponde alla viremia e alla sindrome simil-influenzale con febbre che può essere accompagnata da angina eritomatosa, cefalea, prostrazione oppure diarrea; dopo 3 giorni circa il paziente sembra riprendersi ma, dopo questo breve periodo di regressione della sintomatologia (2-5 giorni), si ha una ripresa febbrile accompagnata dalla

comparsa di segni neurologici quali cefalea, rachialgia, dolori muscolari diffusi (collo, lombi, fianco, addome), indici di irritazione meningea.

Successivamente compare la paralisi, preceduta solitamente da un'accentuazione della sintomatologia dolorosa localizzata nel segmento muscolare che sarà colpito. La compromissione dei moto-neuroni può essere focale o generalizzata; la paralisi è flaccida, con distribuzione asimmetrica ed irregolare, alcune volte estesa a diversi gruppi muscolari mentre altre limitata ad alcuni muscoli o fasci di fibre. Sono colpiti più spesso gli arti inferiori (circa il 60% dei casi) dei superiori (circa il 25% dei casi), più i gruppi muscolari flessori degli estensori. Il coinvolgimento più comune è quello di un solo arto inferiore ma non è infrequente una compromissione più estesa che interessa i muscoli del torace e dell'addome (portando eventualmente a paraplegia). La fase dei postumi può essere suddivisa in una fase sensitiva, durante la quale persistono i disturbi dolorosi, ed una fase asensitiva successiva in cui inizia il recupero (sia quello spontaneo, dovuto alla regressione della flogosi, sia quello ottenibile con la terapia, dovuto all'ipertrofia vicariante di fibre muscolari superstiti). Possono comunque permanere sequele, come contratture dei muscoli flessori dell'anca e del ginocchio o piede equino.

Forma bulbare: rappresenta il 10-15% dei casi di poliomielite paralitica. Il termine bulbare si riferisce al fatto che sono interessati i nervi cranici o i centri midollari che controllano la respirazione ed il sistema vasomotore. I nervi cranici più frequentemente colpiti sono il IX e il X, con conseguente paralisi dei muscoli della faringe e della laringe che clinicamente si manifesta con difficoltà di deglutizione e con disfonia. Il coinvolgimento dei nervi cranici VII e XII conduce rispettivamente a debolezza dei muscoli della faccia e della lingua (7). Il quadro è più grave se sono colpiti i centri del respiro e della circolazione, nel midollo allungato (o bulbo), con irregolarità del ritmo del respiro e del polso, della pressione arteriosa. La poliomielite paralitica bulbare può dare gravi disturbi neurovegetativi, fino al coma, all'arresto cardiaco e respiratorio, ed è associata ai più alti tassi di mortalità (fino al 75%). Tuttora ci sono ancora individui colpiti dalla paralisi dei muscoli respiratori che sopravvivono grazie ad un supporto respiratorio. Il coinvolgimento del sistema autonomo, può manifestarsi anche con anomalie nella sudorazione, nella minzione e nella defecazione (7).

A volte la forma spinale e quella bulbare si associano nel corso della malattia, risultando in una *paralisi bulbo-spinale* (7).

Altre forme (più rare): le forme cerebellare (atassia, in coordinazione motoria), mesencefalica (ptosi palpebrale, strabismo) ed encefalica (paralisi spastiche, convulsioni, coma. E' praticamente indistinguibile da altre forme di encefalite virale.

2.2.4.1.2 *La sindrome post-poliomielitica*

La sindrome post-poliomielitica può verificarsi a distanza di 15-40 anni dall'episodio acuto di poliomielite. Secondo stime dell'OMS, si manifesta nel 25-40% delle persone che hanno contratto la polio-paralisi nella loro infanzia.

Non si tratta di un processo infettivo: le persone che manifestano la sindrome non eliminano il poliovirus.

La sindrome inizia insidiosamente con astenia e segni di interessamento neuromuscolare, come dolore, atrofia e fascicolazioni a carico prevalentemente, ma non esclusivamente, dei distretti muscolari colpiti durante l'attacco acuto (8). Altri segni sono la difficoltà di respiro e di deglutizione, i disturbi del sonno e l'intolleranza al freddo, ma sono meno comuni. La prognosi è comunque buona, con progressione molto lenta.

I fattori di rischio includono l'età avanzata al momento dell'infezione acuta, l'estensione della paralisi iniziale, un eccessivo esercizio muscolare, il grado di remissione della sintomatologia dopo l'attacco acuto, quindi l'eventuale persistenza di un danno residuo dopo la guarigione dalla poliomielite paralitica. Non è stata ancora ben definita la patogenesi. Alcuni ritengono che la sindrome sia l'espressione di un danno da denervazione a carattere progressivo, dovuto all'infezione persistente o recidivante dei neuroni (8): diversi studi riportano un'infezione persistente da poliovirus nel liquor o in tessuti del sistema nervoso centrale di soggetti che hanno sviluppato un'atrofia muscolare progressiva postpoliomielitica (33) (50) (51) (52) (53). Ma altri non confermano questi dati (54) (55).

2.2.5 Diagnosi

Fondamentalmente la diagnosi è di tipo clinico-epidemiologica. Un dato significativo è la presenza di un focolaio epidemico noto di poliomielite.

Nelle forme paralitiche è possibile diagnosticare l'infezione sulla base del quadro clinico, in quanto sono presenti sintomi molto caratteristici. Fortunatamente, la situazione epidemiologica creatasi nel nostro Paese con la vaccinazione obbligatoria rende oggi improbabile l'osservazione della malattia, ma in ogni caso sospetto si impone una diagnosi di tipo differenziale. Ad esempio, vanno escluse le nevralgie da virus coxsackie ed echo, le mieliti, le nevralgie post-infettive e post-vaccinali, le encefaliti virali, la sindrome di Guillain-Barré, le paralisi da difterite, botulino e tetano.

Invece, nelle forme non paralitiche, la diagnosi clinica è impossibile.

L'accertamento diagnostico è possibile mediante l'isolamento in coltura cellulare del virus dai tamponi rettali o dalle feci per diverse settimane dall'infezione e da tamponi faringei effettuati in una fase precoce della malattia. La presenza del virus è rilevata attraverso l'evidenziazione di un caratteristico effetto citopatico. L'isolamento dal liquor non è molto efficace.

Le indagini sierologiche vengono effettuate tramite la rilevazione dell'aumento di almeno quattro volte del titolo anticorpale (anticorpi neutralizzanti e fissanti il complemento) su due campioni di siero: il primo prelevato il più precocemente possibile in fase acuta ed il secondo prelevato 3-4 settimane dopo, in fase convalescente.

Infine le tecniche di biologia molecolare consentono di evidenziare rapidamente e con sicurezza i poliovirus, di identificarne il sierotipo e di distinguere tra i poliovirus selvaggi e quelli di derivazione vaccinale.

2.2.6 Prognosi

Nella poliomielite paralitica, la prognosi dipende strettamente dall'entità e dal tipo di lesioni. Nella maggior parte dei pazienti, la febbre scompare alcuni giorni dopo l'insorgenza della paralisi e si rendono meglio evidenti i deficit muscolari. La riduzione dei processi flogistici conduce talora alla risoluzione di quadri paralitici apparentemente assai estesi, mentre danni minimi, sfuggiti all'osservazione durante la fase acuta, possono poi rivelarsi invalidanti. Generalmente, il recupero della forza muscolare avviene in gran parte nei primi 3 o 4 mesi ed è il risultato del ritorno alla normalità morfologica dei neuroni parzialmente danneggiati. Non si risolvono invece le paralisi dovute a distruzione di motoneuroni.

La più frequente causa di morte è costituita dall'insufficienza respiratoria, causata dalla paralisi del diaframma e dei muscoli intercostali, oppure da lesioni del centro bulbare. Questi disturbi possono

essere aggravati dalla paralisi dei muscoli adibiti alla deglutizione, con conseguenti fenomeni ostruttivi (8).

La sintomatologia e la prognosi sono più gravi negli adulti nei quali la paralisi può presentarsi con frequenza maggiore rispetto alla meningite asettica o alla forma abortiva (56). Una possibile spiegazione potrebbe risiedere nell'aumento, con l'età, della velocità assonale, che appare importante nella diffusione del virus al sistema nervoso centrale (57).

Il tasso di letalità per la malattia paralitica aumenta all'aumentare dell'età del soggetto, essendo del 2-5% nei bambini ed oltre il 15-30% negli adulti con la forma spinale di paralisi, mentre raggiunge il 25-75% se c'è coinvolgimento bulbare (58).

2.2.7 Terapia

Dal momento che non esistono trattamenti specifici perché nessun farmaco disponibile si è rilevato efficace, nelle forme neurologiche gravi sono impiegate terapie di supporto.

L'interessamento bulbare si dimostra quasi sempre insensibile ad ogni forma di trattamento. I pazienti nei quali si sospetti una poliomielite paralitica dovrebbero essere ospedalizzati; se compaiono segni di interessamento del sistema nervoso, è necessario controllare la deglutizione, le funzioni vitali, il polso e la pressione del sangue per impedire eventuali complicazioni respiratorie e circolatorie. E' fondamentale il riposo a letto perché l'esercizio muscolare aggrava il danno estendendo la paralisi.

Sono utili degli impacchi caldi e dei farmaci antispasmodici sia per dare sollievo dagli spasmi muscolari inducendo il rilassamento muscolare sia, in una fase precoce della convalescenza, per prevenire deformità o contratture muscolari permanenti.

Nel caso della paralisi della muscolatura degli arti, bisogna usare la sedia a rotelle o degli speciali sostegni, quali tavolette per i piedi, stampelle, stecche per le braccia e rulli per le ginocchia. Le prove diagnostiche di forza muscolare non vanno eseguite per più di 3 volte alla settimana e la fisioterapia (per stimolare i muscoli) non va cominciata prima che la progressione della paralisi non si sia arrestata.

Il trattamento delle complicazioni polmonari e circolatorie, non differisce da quello attuato per altre malattie neurologiche, come la miastenia grave o la polineuropatia acuta ascendente, ed è effettuato preferibilmente nelle unità specializzate per il trattamento intensivo dell'insufficienza respiratoria. Nei casi di paralisi del diaframma e degli intercostali si impiegano letti a dondolo e soprattutto respiratori meccanici. Fino agli anni '40-50 venivano usati i polmoni d'acciaio, ora si preferisce usare ventilatori a pressione positiva.

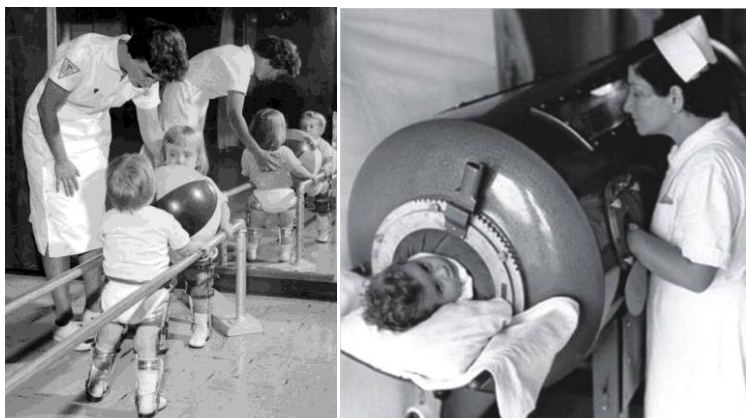


Figura 20. Riabilitazione e assistenza respiratoria attraverso il polmone d'acciaio
(Fonte: <http://medbunker.blogspot.it>)

La paralisi della deglutizione impone la tracheotomia, l'uso dei respiratori a pressione positiva e frequenti aspirazioni delle secrezioni stagnanti (8).

Un problema da non sottovalutare è la comparsa di stipsi e di disfunzioni a livello della vescica. Inoltre le forme paralitiche richiedono sempre un trattamento per evitare l'insorgenza di complicanze infettive, in particolare quelle polmonari ed urinarie.

Sfortunatamente, tutti i trattamenti appena elencati possono migliorare la mobilità residua, ma non sono in grado di far regredire una polio-paralisi permanente.

Dunque non esistono cure per la poliomielite, se non trattamenti sintomatici che possono solo in parte minimizzare gli effetti della malattia. L'unica strada per evitare potenziali conseguenze è la prevenzione tramite vaccinazione.

2.2.8 La prevenzione

La prevenzione della poliomielite è attuabile principalmente attraverso:

- la vaccinazione;
- l'educazione sanitaria;
- l'adozione di misure volte al risanamento ambientale, come la potabilizzazione dell'acqua ed un adeguato sistema di smaltimento delle acque reflue;
- il controllo nel consumo di alimenti a rischio, quali vegetali e molluschi.

La vaccinazione rappresenta lo strumento fondamentale di prevenzione, infatti, fin dalla sua introduzione a metà del XX secolo, ha permesso di combattere efficacemente la poliomielite e di mirare alla sua eradicazione.

Sono tuttora disponibili i due vaccini anti-polio: il vaccino a virus inattivato (ucciso) di Salk a somministrazione sottocutanea o intramuscolare (IPV) ed il vaccino a virus vivo ed attenuato di Sabin a somministrazione orale (OPV). Entrambi sono trivalenti, quindi conferiscono immunità contro tutti e tre i sierotipi di poliovirus.

L'IPV è stato introdotto negli U.S.A. nel 1955, mentre in Italia venne reso disponibile due anni dopo e solo su base volontaria. A partire dai primi anni '60, venne sostituito dall'OPV.

In Italia, dal 1966 la vaccinazione contro la poliomielite deve essere obbligatoriamente praticata per legge a tutti i nuovi nati. Oggi, a causa della possibilità (anche se rara) di una polio-paralisi associata all'OPV, è stato reintrodotta il vaccino di Salk soprattutto negli Stati Uniti ed in Europa, Paesi polio-free, in cui non si verificano più casi di paralisi da poliovirus selvaggio e dove quindi non può essere accettata la comparsa di paralisi dovute alla vaccinazione. Invece il vaccino di Sabin è impiegato nelle vaccinazioni di massa nei Paesi non ancora polio-free, poiché è più facile da somministrare, meno costoso e più efficace, in quanto permette anche la formazione di un'immunità di massa.

Prima dell'avvento della vaccinazione antipolio, annualmente in Italia si verificavano alcune migliaia di casi di polioparalisi (un picco fu registrato nel 1958 con più di 8.000 casi) ai quali si associavano centinaia di decessi. Erano colpiti per lo più bambini in età scolare e per tale motivo la malattia veniva anche chiamata "paralisi infantile". Dopo l'introduzione della vaccinazione prima con il vaccino Salk e poi con il vaccino Sabin la malattia subì una drastica riduzione fino alla definitiva scomparsa di casi avvenuta all'inizio degli anni '80. Oggi la poliomielite, per effetto dell'alto numero di vaccinati, risulta eliminata in tutti i Paesi industrializzati. In alcuni Paesi in via di sviluppo, dove la copertura vaccinale è inadeguata si registra ancora qualche migliaio di casi di poliomielite paralitica. Tuttavia, grazie alle attività per

l'eradicazione della poliomielite, il numero dei casi di poliomielite è diminuito, anche in questi Paesi, di oltre l'85% in poco più di un decennio.

2.2.8.1 Vaccino a virus inattivato di Salk: IPV (Inactivated Polio Vaccine)

Caratteristiche

L'IPV, detto anche vaccino di Salk dal nome del suo ideatore, è un preparato trivalente ottenuto coltivando separatamente i tre tipi di poliovirus in colture di cellule renali di scimmia (linea cellulare Vero), filtrando il liquido colturale per allontanare cellule e detriti cellulari e procedendo all'inattivazione dei virus con formaldeide a 37°C e pH 7. La formaldeide inattiva chimicamente il virus, inibendone la replicazione. Una dose è costituita da 1 ml della sospensione trivalente e viene somministrata per via sottocutanea o intramuscolare. Il vaccino attualmente distribuito contiene 2-fenossietanolo come conservante e tracce di neomicina, streptomina e polimixina B.

Immunogenicità ed efficacia

Poiché è trivalente produce immunità contro tutti e 3 i tipi di poliovirus. La protezione contro la malattia paralitica correla con la presenza di anticorpi. IPV è altamente efficace nell'indurre una risposta immunitaria contro i poliovirus e la protezione dalla poliomielite paralitica: dopo due dosi almeno il 90% dei riceventi sviluppa anticorpi circolanti protettivi contro i tre sierotipi, mentre dopo tre dosi almeno il 99% [61]. La durata dell'immunità non è nota con certezza, ma è molto probabile che un ciclo vaccinale completo conferisca una protezione per decenni (forse per tutta la vita), ma i titoli anticorpali diminuiscono nel tempo, di solito i primi a decadere sono contro il poliovirus di tipo 3.

Vantaggi

L'IPV induce efficacemente la produzione di anticorpi protettivi nel sangue (immunità umorale), prevenendo così la diffusione di tutti e tre i tipi di poliovirus nel sistema nervoso centrale.

Trattandosi di un vaccino a virus inattivato (ucciso), non comporta lo sviluppo di forme di poliomielite post-vaccinica e può essere somministrato in associazione con altri vaccini o agli immunodepressi ed ai loro familiari (il virus vaccinale, non potendosi replicare nell'organismo, non viene eliminato dai vaccinati nell'ambiente).

Svantaggi

Uno dei maggiori svantaggi dell'IPV è che induce una scarsa immunità nel tratto gastrointestinale. Infatti i poliovirus vaccinali, essendo inattivati, non si possono replicare nelle mucose intestinali quindi non portano alla produzione di immunoglobuline di tipo A.

Di conseguenza, quando una persona immunizzata con IPV si infetta con il poliovirus selvaggio, può trasmettere l'infezione ad altre persone: il poliovirus selvaggio si moltiplica nell'intestino per poi essere eliminato con le feci.

Quindi il vaccino di Salk fornisce una protezione individuale contro i poliovirus, ma non può prevenirne la diffusione. Per questo motivo, l'OPV è il vaccino di scelta quando scoppia un'epidemia di polio anche nei Paesi che utilizzano routinariamente l'IPV.

Altri svantaggi dell'IPV includono:

- il costo elevato (almeno 5 volte superiore a quello di OPV), derivato dalle spese per la produzione (data la richiesta di grandi quantità di virus dalle colture tissutali) e per la somministrazione del vaccino (siringhe, personale addestrato per le procedure di iniezione sterile, etc);
- la modalità di somministrazione: iniezione intramuscolare o sottocutanea;
- la durata dell'immunità: è di alcuni anni ma non è permanente, quindi necessita di richiami.

2.2.8.2 Vaccino a virus vivo e attenuato di Sabin: OPV (Oral Polio Vaccine)

Caratteristiche

L'OPV, detto anche vaccino di Sabin è costituito da una sospensione dei tre tipi di poliovirus vivi e attenuati, ottenuti mediante rapidi passaggi in cellule epiteliali di rene di scimmia (linea cellulare Vero). Contiene anche neomicina e streptomina in tracce. E' trivalente e bilanciato, dal momento che contiene i tre sierotipi in rapporto 10:1:3 (le quantità minori si riferiscono ai ceppi che attecchiscono più facilmente). Sabin cercò, per quanto possibile, di mimare la reale infezione del virus utilizzando una forma attenuata del virus vivo. Partendo dalla constatazione che l'adattamento dei poliovirus a substrati non naturali, quali le colture cellulari, ne determina frequentemente una perdita di virulenza poté separare i cloni virali di interesse e saggiarne l'innocuità e l'efficacia nella scimmia. Sperimentò su più di 9.000 scimmie prima di isolare una rara forma di poliovirus in grado di riprodursi nel tratto intestinale ma non nel sistema nervoso centrale.

Immunogenicità ed efficacia

OPV è altamente efficace nel produrre immunità contro i poliovirus: una singola dose induce immunità contro tutti e tre i sierotipi in circa il 50% dei riceventi, mentre tre dosi nel 95%. La persistenza degli anticorpi neutralizzanti è molto prolungata e sovrapponibile a quella derivante dall'infezione naturale.

L'azione di questo vaccino è duplice: oltre a stimolare la produzione di anticorpi a livello ematico (immunità circolante) prevenendo la diffusione dei virus nel sistema nervoso centrale, induce una risposta immunitaria locale (con produzione di IgA) a livello delle mucose naso-faringea ed intestinale, prima sede di replicazione dei poliovirus selvaggi.

I poliovirus vivi ed attenuati, somministrati per via orale, si moltiplicano a livello delle tonsille, dell'epitelio della mucosa intestinale, delle placche del Peyer e dei linfonodi satelliti. Sono escreti nelle feci dei vaccinati per più di 6 settimane (in particolare, l'escrezione massima si verifica nelle prime 2 settimane dopo la vaccinazione) e possono essere trasmessi ai contatti. L'immunizzazione con OPV nelle aree con scarse condizioni igienico-sanitarie e ad alta incidenza di poliomielite, può infatti risultare in un'immunizzazione passiva dei contatti stretti. In seguito ad un'infezione da poliovirus selvaggio si instaura la cosiddetta "immunità di gregge", laddove almeno l'80% della popolazione sia vaccinata. La predominanza dei soggetti immunizzati, associata all'eliminazione da parte loro di virus attenuato, rende difficoltosa la circolazione del virus selvaggio ponendosi in competizione con esso, rendendo plausibile la prospettiva di una completa eradicazione.

Vantaggi

Il vaccino orale anti-polio offre un'elevata efficacia non solo individuale ma anche di gruppo:

- la risposta immunitaria locale si sviluppa rapidamente ed impedisce l'eliminazione del virus selvaggio con le feci. Inoltre il virus attenuato viene liberato nell'ambiente con le feci dei vaccinati, sostituendo nell'ambiente circostante il virus selvaggio e infettando altri individui (vaccinazione inapparente), che sono poi protetti da successive infezioni. Probabilmente questa risposta è la ragione principale per la quale le campagne di vaccinazione di massa con OPV possono interrompere rapidamente la trasmissione interumana dei poliovirus selvaggi e ridurre la loro presenza nell'ambiente
- E' economico
- Trattandosi di un vaccino somministrato per via orale non richiede la presenza di personale qualificato né di un equipaggiamento sanitario sterile
- Necessita di richiami non frequenti

Grazie a questi vantaggi, l'OPV è il vaccino di scelta per l'eradicazione della poliomielite, obiettivo che non è invece realizzabile con l'IPV. L'OPV viene oggi utilizzato in alcuni Paesi per la vaccinazione routinaria e soprattutto per le campagne di vaccinazione supplementare (immunizzazioni di massa), come le attività di mopping-up e in occasione delle giornate di immunizzazione nazionali.

Svantaggi

Sebbene OPV sia sicuro ed efficace, in casi estremamente rari (circa 1 ogni 2,5 milioni di dosi), può verificarsi una riacquisizione della neurovirulenza, in quanto il virus inattivato ma vivo contenuto nel vaccino può mutare durante la replicazione nell'organismo del vaccinato. A seconda di diverse variabili quali la quantità di revertenti, la loro permanenza nell'organismo e le condizioni immunologiche del soggetto, l'infezione può sfociare in poliomielite paralitica post-vaccinica (VAPP, Poliomielite Paralitica Associata al Vaccino). La VAPP può manifestarsi anche in persone suscettibili che si trovano in contatto con soggetti vaccinati con l'OPV. Non ci sono procedure per determinare quali individui siano a rischio per la VAPP, se non escludere i soggetti anziani e quelli che presentano immunodeficienze. In Italia in 20 anni si sono verificati 17 casi di VAPP in bambini vaccinati e 2 casi in contatti familiari di bambini vaccinati con OPV.

Questo rischio, estremamente basso, di polio-paralisi associata al vaccino è ben noto ed accettato dai Programmi di Sanità Pubblica nei Paesi ad alta incidenza di polioparalisi da poliovirus selvaggi, dato che ogni anno, senza OPV, centinaia o migliaia di bambini andrebbero incontro a paralisi. Invece nei Paesi "polio-free" vengono impiegate schedule di immunizzazione miste (OPV+IPV) o solo ad IPV.

Un altro svantaggio consiste nelle necessarie attenzioni da osservare nella conservazione del vaccino, che va mantenuto a temperature inferiori agli 8°C per mantenerne inalterate le caratteristiche: questa condizione può essere difficile da garantire in contesti particolarmente disagiati, come i Paesi in via di sviluppo. Infatti nelle "Giornate di Immunizzazione Nazionale" (NIDs) viene allestita la cosiddetta "catena del freddo" che impiega refrigeratori per riuscire a trasportare a distanza e nel contempo conservare il vaccino.

I casi in cui il vaccino OPV è inoltre controindicato e va sostituito con l'IPV sono i seguenti:

- Bambini immunosoppressi
- Bambini che convivono con persone immunosopresse
- Primo ciclo vaccinale in adulti

2.2.8.3 Vaccini orali vivi attenuati: monovalenti e bivalenti

La constatazione della scomparsa dal pianeta del poliovirus di tipo 2 nel 2002 e dell'interferenza del virus vaccinico di tipo 2 con le risposte contro i virus vaccinici di tipo 1 e 3, ha portato allo sviluppo di vaccini monovalenti e bivalenti che forniscono una protezione ottimale contro entrambi i sierotipi superstiti del virus della poliomielite. Dal 2005 sono, infatti, disponibili i vaccini monovalenti vivi attenuati per i due tipi di poliovirus ancora circolanti, 1 (mOPV1) e 3 (mOPV3), usati soprattutto per migliorare l'efficienza e l'impatto delle campagne di vaccinazione di massa nei Paesi endemici. Dal 2009 allo stesso scopo viene utilizzato anche un vaccino bivalente vivo attenuato contro il tipo 1 e il tipo 3: bOPV. La capacità di mOPV1 di stimolare il sistema immunitario è maggiore rispetto al trivalente (47). Anche il bivalente risulta avere un'efficacia superiore rispetto al vaccino trivalente e un'efficacia paragonabile ai vaccini monovalenti, mOPV1 e mOPV3, con il vantaggio di però di fornire la protezione contro entrambi i tipi in una sola volta (47).

Secondo uno studio svolto da Sutter e colleghi (59) la sieroconversione per polio 1 a 30 giorni dalla somministrazione della prima dose del vaccino mOPV1 e del bOPV è di circa 20%, ma è inferiore per il

trivalente (15%). Dopo la seconda dose la sieroconversione è di circa l'80% per l'mOPV1 e il bOPV, e di circa il 50% per il vaccino trivalente. La sieroconversione dopo la somministrazione cumulativa delle due dosi era di circa il 90% per il mOPV1 e il bOPV ed era di circa il 60% per il trivalente. La sieroconversione per polio 2 nel trivalente è maggiore rispetto agli altri due sierotipi a qualsiasi dose. La sieroconversione per il polio 3 evidenzia dei risultati simili a quelli per il polio 1, in particolare alla seconda dose è di circa l'80% per il mOPV3 e di circa il 70% per il bOPV, mentre è inferiore per il trivalente (circa il 50%) (59).

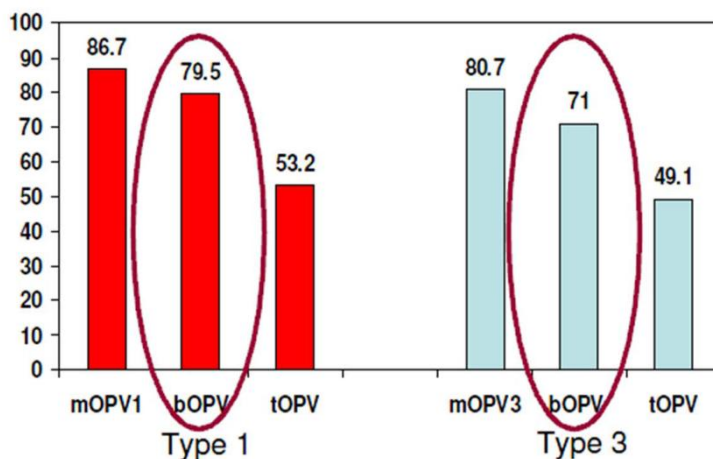


Figura 21. Sieroconversione dopo due dosi di vaccino

Sulla base dei risultati ottenuti in questo ed altri studi clinici di sieroconversione l'Advisory Committee on Poliomyelitis Eradication (ACPE), il corpo consultivo della Global Polio Eradication Initiative, ha raccomandato l'utilizzo del bOPV per la vaccinazione routinaria, come supporto del vaccino trivalente, e per le attività di immunizzazione supplementare, a fianco del trivalente e dei monovalenti.

Il vaccino bivalente è stato utilizzato per la prima volta il 15 dicembre 2009 in Afghanistan per la vaccinazione di oltre 2.8 milioni di bambini sotto i cinque anni di età durante la campagna di immunizzazione sub-nazionale condotta dal 15 al 17 dicembre 2009 nelle regioni meridionali, sud-orientali e orientali dell'Afghanistan. Questo vaccino ha consentito di semplificare le questioni logistiche legate alle vaccinazioni nelle aree del Paese colpite dai conflitti e di ottimizzare la protezione. La sua disponibilità è stata parte di una nuova strategia specifica per area condotta per raggiungere il traguardo dell'eradicazione della poliomielite più velocemente (47).

2.2.8.4 Polio-paralisi associata al vaccino OPV (VAPP)

La VAPP è clinicamente indistinguibile dalla paralisi causata da poliovirus selvaggi (60). La polio-paralisi associata a vaccino è una reazione avversa rara che segue l'assunzione del vaccino OPV (di solito entro 60 giorni), e che può anche manifestarsi in persone suscettibili che si trovano in contatto con soggetti vaccinati con l'OPV. Non c'è nessuna procedura disponibile per identificare le persone a rischio, tranne quella di non vaccinare persone con età avanzata ed immunodeficienti. Si verifica con maggiore probabilità in persone con più di 18 anni piuttosto che nei bambini e più in bambini immunodepressi che in quelli immunocompetenti. Rispetto ai soggetti immunocompetenti, il rischio di VAPP è circa 7.000 volte più alto in persone che presentano alcuni tipi di deficit immunitari, in particolare a carico dei

linfociti B (per esempio agammaglobulinemia ed ipogammaglobulinemia) che comportano una ridotta sintesi di immunoglobuline (61).

Inoltre il rischio di VAPP non è uguale per tutte le dosi di OPV del ciclo vaccinale: è 7-21 volte maggiore per la prima dose rispetto alle successive. La ragione di questa differenza non è nota con certezza, ma è probabile che il virus vaccinale sia in grado di replicarsi più a lungo in un soggetto completamente privo di immunità. Questa replicazione prolungata aumenta la possibilità che emergano virus mutati che possono causare la paralisi (58).

La situazione è simile per i contatti: un soggetto immunodeficiente potrebbe eliminare il virus più a lungo, aumentando la possibilità di esposizione del contatto.

Il meccanismo che conduce allo sviluppo di questa forma di paralisi consiste in mutazioni o retromutazioni del poliovirus vaccinale che ne ripristinano la neurovirulenza dato che la differenza genomica tra il virus selvaggio e quello attenuato consiste in mutazioni puntiformi specifiche.

Questo è dovuto al fatto che i poliovirus, come gli altri virus ad RNA, possiedono una RNA polimerasi RNA-dipendente, quindi "error-prone", che li rende soggetti ad un alto tasso di mutazione. In particolare, si ritiene che tutti e tre i sierotipi di poliovirus vaccinale vengano mutati a livello del determinante maggiore per la neurovirulenza nel sito d'entrata interno del ribosoma nella regione 5'-UTR.

Il sierotipo che più frequentemente è interessato è il 3, meno comunemente il 2 e raramente l'1. Tale differenza potrebbe dipendere dalla maggiore somiglianza del ceppo vaccinale con il poliovirus 3. Secondo alcuni studi di diversi decenni fa svolti in Ungheria, Stati Uniti e Germania orientale l'utilizzo del vaccino monovalente per il poliovirus 3 (mOPV3) sembrava essere associato a un maggior rischio di sviluppare una VAPP rispetto agli altri vaccini (62). È degno di nota il fatto che nonostante il poliovirus di tipo 2 sia scomparso dal mondo dal 1999 nei Paesi che vaccinano con OPV si registrano ancora casi di paralisi attribuibili al ceppo di polio 2 di tipo vaccinale.

Prove di isolamento virale da feci e dal sistema nervoso centrale di pazienti con VAPP hanno dimostrato l'esistenza contemporanea di poliovirus appartenenti a genotipi diversi in uno stesso paziente, incluse forme ricombinanti dei tre sierotipi. E' stato anche dimostrato che è possibile una ricombinazione tra poliovirus e enterovirus non-polio.

I casi di VAPP sono stati osservati quasi immediatamente dopo l'introduzione dei vaccini vivi attenuati (63).

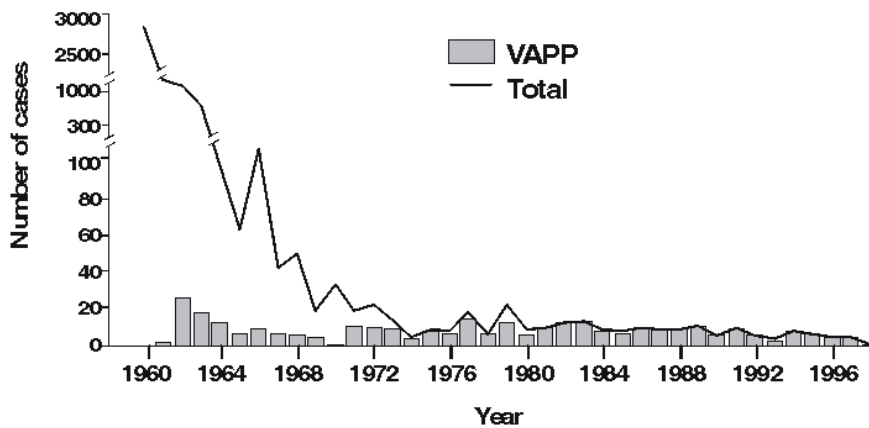
Secondo i dati del Ministero, in Italia, dal 1986 al 1993, i casi segnalati sono stati cinque.

E' chiaro che di fronte al numero di casi di poliomielite evitati, stimabili in Italia dal 1964 in circa 90.000, si tratta di un numero esiguo e tale da non inficiare la validità della politica vaccinale adottata (64).

Il rischio globale di VAPP è di circa 1 caso ogni 2,4 milioni di dosi di OPV, con un rischio alla prima dose di 1 caso ogni 750.000 dosi distribuite e 1 caso ogni 5,1 milioni di dosi successive alla prima (Tabella 4) (65).

Negli Stati Uniti d'America tra il 1980 e il 1995 sono stati registrati 132 casi di VAPP (Figura 22) (CDC, dati non pubblicati). 52 di queste paralisi riguardavano riceventi sani, 41 erano persone che avevano contatti stretti con soggetti che avevano ricevuto il vaccino OPV e 7 erano invece stati classificati come "community contacts", cioè erano persone da cui è stato il poliovirus vaccinale, ma che non avevano ricevuto il vaccino di recente e non avevano avuto contatti stretti con chi lo aveva ricevuto. 32 casi di paralisi riguardavano persone con alterazioni del sistema immunitario che avevano ricevuto l'OPV o che avevano avuto stretti contatti con soggetti riceventi il vaccino (Tabella 4).

FIGURE. Total number of reported paralytic poliomyelitis cases and total number of reported vaccine-associated paralytic polio (VAPP) cases — United States, 1960–1998*



*Updated June 16, 1999.

Figura 22. Casi di VAPP negli Stati Uniti (Fonte: CDC)

TABLE. Ratio of the number and type of cases of vaccine-associated paralytic poliomyelitis (VAPP) to the number of doses of trivalent oral poliovirus vaccine (OPV)* distributed — United States, 1980–1995

Case category	Ratio of VAPP cases to doses of OPV distributed [†] (and number of VAPP cases)		
	All doses	First doses	Subsequent doses
Recipient	1: 6.1 (52)	1: 1.4 (43)	1: 28.9 (9)
Contact	1: 7.7 (41)	1: 2.3 (26)	1: 17.3 (15)
Community-acquired	1: 45.3 (7)	NA	NA
Immunologically abnormal [‡]	1: 9.9 (32)	1: 5.1 (12)	1: 13.0 (20)
Total	1: 2.4 (132)	1: 0.75 (81)	1: 5.1 (51)

*Live, attenuated vaccine.

[†]In millions.

[‡]Because the denominator is doses of OPV distributed, the calculated ratio is low. However, if the denominator is the number of immunodeficient infants born each year, the risk for VAPP among immunodeficient infants is 3,200-fold to 6,800-fold higher than among immunocompetent infants (Sutter RW, Prevots DR. Vaccine-associated paralytic poliomyelitis among immunodeficient persons. *Infect Med* 1994;11:426,429–30,435–8).

Tabella 4. Tasso di casi di VAPP negli Stati Uniti (Fonte: CDC)

In diversi Paesi, tra cui l'Italia, dopo aver constatato che la maggior parte dei casi di paralisi conseguenti alla somministrazione di vaccino OPV negli anni '90 si erano verificati dopo la prima somministrazione, e tenuto conto che una parte di questi casi poteva essere legata a una retro-mutazione del poliovirus vaccinicò con un ritorno alla virulenza, si è pensato che una preliminare immunizzazione con IPV poteva prevenire le conseguenze di tale evento. Pertanto si modificò la schedula vaccinale introducendo per le prime due dosi il vaccino da virus ucciso tipo Salk (IPV) e mantenendo l'OPV per le ultime due dosi. Dall'introduzione nel 1997 della schedula IPV-OPV si osserva un declino dei casi di VAPP negli Stati Uniti: 5 casi di VAPP nel 1997 e 2 nel 1998. 3 di questi casi sono associati alla somministrazione del vaccino, alla prima o alla seconda dose, a bambini che non avevano precedentemente ricevuto l'IPV e 1 era invece associato alla somministrazione della terza dose. L'Italia, dichiarata polio-free dall'OMS insieme al resto dell'Europa Occidentale, nel 2002 abbandonava completamente il vaccino OPV per adottare l'immunizzazione di base con quattro somministrazioni di IPV.

Il problema dell'incapacità del vaccino IPV di svolgere un'azione immunogena a livello ecologico non dovrebbe potersi porre nelle popolazioni dei paesi sviluppati dove la morbilità per poliomielite è ormai ridotta a zero e dove la disseminazione dell'agente infettivo selvaggio è ormai assente.

Nei paesi in via di sviluppo, dove il problema sussiste, il vaccino OPV è ancora in uso. Solo in caso di accensione di un focolaio epidemico, laddove ora viene usato il vaccino IPV, si imporrebbe nuovamente l'uso dell'OPV, del quale viene comunque conservata una scorta per le emergenze.

Factor	OPV	IPV	IPV/OPV
Occurrence of VAPP	Eight to nine cases per year	None	Two to five cases per year*
Other serious adverse events	None known	None known	None known
Systemic immunity	High	High	High
Immunity of gastrointestinal mucosa	High	Lower	High
Secondary transmission of vaccine virus	Yes	No	Some
Extra injections or office visits needed	No	Yes	Yes
Future combination vaccines	Unlikely	Likely	Likely (IPV)

OPV = oral poliovirus vaccine; IPV = inactivated poliovirus vaccine; IPV/OPV = sequential vaccination of IPV followed by OPV; VAPP = vaccine-associated paralytic poliomyelitis.

*—Estimated.

Adapted from Centers for Disease Control and Prevention. Poliomyelitis prevention in the United States: introduction of a sequential vaccination schedule of inactivated poliovirus vaccine followed by oral poliovirus vaccine. Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). MMWR Morb Mortal Wkly Rep 1997;46(RR-3):12 [Published erratum in MMWR Morb Mortal Wkly Rep 1997;46:183].

Tabella 5. Modifiche nella schedula vaccinale (66)

2.2.8.5 Virus di derivazione vaccinale (Vaccine-Derived PolioVirus - VDPV)

I virus vaccinali sono rari ceppi di poliovirus originati dal ceppo presente nel vaccino orale (OPV) e mutati geneticamente. Quando un bambino viene vaccinato con il virus orale attenuato, questo replica nell'intestino e va in circolo a livello ematico, attivando la risposta immunitaria protettiva nel bambino. Come avviene per i poliovirus selvaggi, il bambino espelle il virus vaccinale per un periodo di sei-otto settimane. È importante sottolineare che, quando vengono escreti, alcuni virus vaccinali possono non essere più uguali al virus vaccinale originale, ma essere geneticamente modificati durante la replicazione; questi sono i poliovirus derivati dal vaccino. Esistono tre tipi di poliovirus derivati dal vaccino:

1. Poliovirus Vaccino-Derivati legati all'Immunodeficienza (Immunodeficiency-related Vaccine-Derived PolioVirus - iVDPV)

La replicazione prolungata dei virus di derivazione vaccinale è stata osservata in un piccolo numero di persone con rari disturbi di immunodeficienza. Non essendo in grado di montare un'adeguata risposta immunitaria, queste persone non sono in grado di interrompere l'eliminazione intestinale del virus vaccinale, entro sei-otto settimane, come solitamente avviene. Essi quindi espellono i poliovirus vaccino-derivati correlati all'immunodeficienza (iVDPVs) per periodi prolungati. La presenza di iVDPV è molto rara: solo 33 casi sono stati documentati in tutto il mondo e di questi, la maggior parte ha interrotto l'escrezione entro sei mesi o è morto (3).

2. Poliovirus Vaccino-derivati Ambigui (Ambiguous Vaccine-Derived PolioVirus - aVDPV)

Sono poliovirus di derivazione vaccinale che sono o isolati da persone senza immunodeficienza nota, o isolati dalle acque di scarico la cui ultima sorgente è sconosciuta. Si sa comunque molto poco su di loro.

3. Poliovirus Vaccino-Derivati Circolanti (Circulating Vaccine-Derived Poliovirus - cVDPV)

In rare occasioni, se in una popolazione è presente un elevato numero di soggetti non immunizzati, i virus vaccino-derivati possono iniziare a circolare nella comunità. Questi virus sono i cVDPV. Minore è la copertura immunitaria della popolazione, più a lungo questi virus sopravvivono e diffondono nella comunità, continuando a replicare, a modificarsi e a scambiare materiale genetico con altri enterovirus. Le mutazioni a cui vanno incontro li rendono sempre più lontani dai ceppi Sabin-like da cui originano e sempre più simili ai poliovirus selvaggi. I cVDPV sono capaci di causare paralisi nell'uomo hanno la capacità potenziale o dimostrata di sostenere una circolazione. Per tale motivo risulta di notevole importanza ed interesse monitorare oltre a infezioni di poliovirus selvaggio quelle da cVDPVs (3).

I fattori chiave che favoriscono la comparsa e la diffusione di cVDPV sono gli stessi per la circolazione di poliovirus selvaggi: bassa copertura con OPV, scarse misure igienico-sanitarie, alta densità di popolazione e condizioni tropicali. Se una popolazione è completamente immunizzata contro la polio, sarà protetta contro la diffusione sia dei ceppi selvatici e di quelli di derivazione vaccinale. In zone a bassa copertura vaccinale i VDPV possono causare focolai epidemici, descritti per esempio in Egitto, Cina, Haiti, Repubblica Dominicana e Filippine. Tutti questi focolai sono stati controllati migliorando l'immunità della popolazione con la vaccinazione OPV (47).

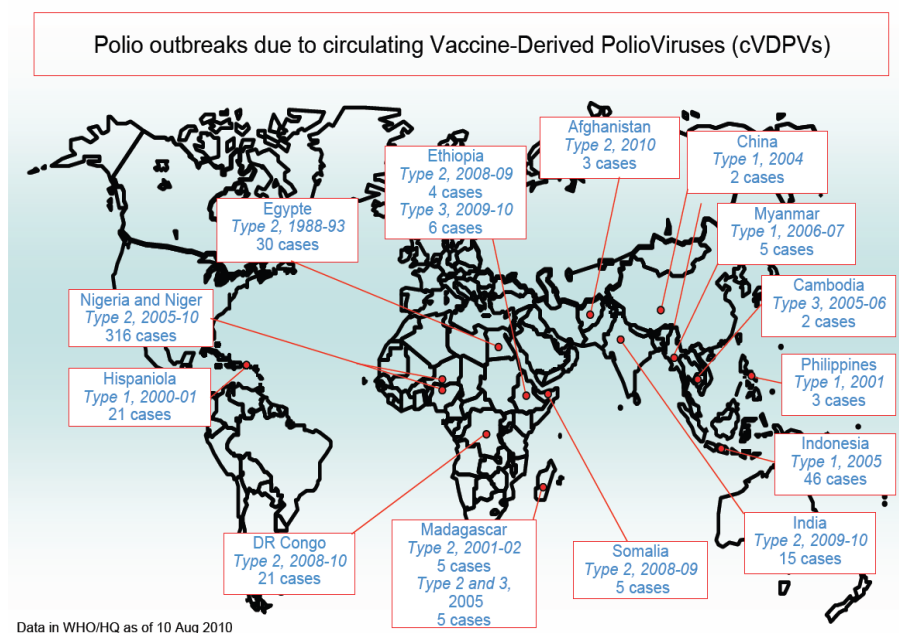


Figura 23. Casi cVDPV 1988-2010 (Fonte: OMS)

Gli episodi di circolazione di poliovirus derivati dal vaccino sono comunque piuttosto rari. Tra il 2000 e il 2011, un periodo in cui sono stati dati più di 10 miliardi di dosi di vaccino antipolio orale in tutto il mondo, si sono verificati 20 focolai cVDPV, causando 580 casi di polio e nello stesso periodo, i poliovirus selvaggi hanno paralizzato oltre 15.500 bambini (3). Fino al 18 dicembre di quest'anno sono inoltre stati registrati 54 VDPV (3) (Tabella 6).

Country	cVDPV type 1*													Most recent transmission chain		
	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	First case	Most recent case	Duration in weeks
Mozambique												2		10-Feb-11	02-Jun-11	16
Myanmar							1	4						30-Apr-07	06-Dec-07	31
Indonesia						46								09-Jul-05	26-Oct-05	15
China				2										13-Jun-04	11-Nov-04	21
Philippines		3												15-Mar-01	26-Jul-01	19
DOR/Haiti	12	9												12-Jul-00	12-Jul-01	52
Total type 1	12	12	0	0	2	46	1	4	0	0	0	2	0			
Country	cVDPV type 2*													Most recent transmission chain		
	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	First case	Most recent case	Duration in weeks
Afghanistan										5	1	3		10-Jun-10	15-Nov-12	127
Pakistan												12		30-Aug-12	04-Nov-12	9
Chad										1		12		25-Aug-12	20-Oct-12	8
Nigeria					3	22	71	66	154	27	34	4		02-Jul-05	16-Aug-12	371
Somalia								1	6	1	9	1		19-Apr-11	23-Jul-12	65
Kenya												3		18-Apr-12	25-Jun-12	9
DR Congo								13	5	18	11	17		04-Nov-11	04-Apr-12	21
Niger							2			2	1	1		11-Nov-11	11-Nov-11	<1
Yemen												9		09-Apr-11	05-Oct-11	25
India									15	2				19-Oct-09	18-Jan-10	13
Ethiopia								3	1					04-Oct-08	16-Feb-09	19
Madagascar		1	4			3								26-Jun-05	13-Jul-05	2
Total type 2	0	1	4	0	0	6	24	71	83	183	55	65	52			
Country	cVDPV type 3*													Most recent transmission chain		
	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	First case	Most recent case	Duration in weeks
Yemen												2		27-Apr-12	24-Aug-12	17
Ethiopia										1	6			27-Apr-09	17-May-10	55
Cambodia						1	1							26-Nov-05	15-Jan-06	7
Total type 3	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	6	0	2			

1Circulating Vaccine-derived poliovirus (cVDPV) is associated with 2 or more cases of AFP. Niger 2006, Niger 2009, Niger 2010, Chad 2010 cVDPVs are linked to the Nigeria outbreak. Kenya 2012 cVDPVs are linked to the Somalia outbreak. VDPV type 2 cases with greater than or equal to 6nt difference from sabin in VP1; VDPV types 1 and 3 cases with greater than or equal to 10nt difference from sabin in VP1 are reported here. Figures exclude VDPV from non-AFP sources. Nigeria figures include the following cases with WPV1/cVDPV2 mixture: 2005 - 2, 2006 - 1, 2007 - 1, 2008 - 3, 2009 - 1, 2011 - 1; WPV3/cVDPV2 mixture 2007 - 2. *Figures include multiple emergences and transmission chains. **cVDPVs due to importation. Data at WHO/HQ as of 18 Dec 2012

Tabella 6. Circulating vaccine-derived poliovirus (cVDPV) 2000-2012

Di particolare rilevanza però risulta il fatto che nel 2005 si sono verificati più casi da poliovirus vaccinale che da poliovirus selvaggio (67) in seguito alla più grande epidemia registrata di cVDPV (1 gennaio 2005 - 30 giugno 2009) rilevata in Nigeria. Questa epidemia ha fornito l'opportunità di analizzare la patogenicità del virus, la gravità clinica della malattia e l'efficacia delle misure di controllo (68):

- Nessuna differenza significativa è stata riscontrata nella gravità clinica delle paralisi tra i casi cVDPV e i casi di poliovirus selvaggio 1 e 3.
- I tassi medi annui stimati di attacco clinico per 100.000 bambini suscettibili al di sotto dei 5 anni di età, erano di 6,8 per il PV1, 2,7 per il cVDPV2 e 4,0 per il PV3.
- L'efficacia stimata per dose del vaccino tOPV contro la paralisi di tipo cVDPV2 era del 38% (95% CI, 15-54%), nettamente superiore a quella contro la paralisi di tipo 1 (13%, 95% CI, 8-18%), o di tipo 3 (20%, 95% CI, da 12 a 26%).
- L'uso più frequente di mOPV1 e mOPV3 ha portato a miglioramenti nell'immunità di popolazione indotta dal vaccino contro questi sierotipi e in un declino nell'immunità contro il tipo 2 cVDPV.

Il tasso di attacco e la gravità della malattia associata con i recenti cVDPV2 individuati in Nigeria sono simili a quelli associati con poliovirus selvaggi.

Una pianificazione internazionale per la gestione del rischio di poliovirus selvaggi, sia prima che dopo l'eliminazione, deve comprendere gli scenari in cui potrebbero emergere poliovirus cVDPV altrettanto virulenti e patogeni.

2.2.8.6 *La vaccinazione anti-polio in Italia*

In Italia il vaccino Salk (IPV) venne adottato nel 1957. Nel biennio '59-'60 viene raccomandata la vaccinazione per persone da 0 a 20 anni quando l'incidenza della poliomielite raggiunge il suo picco in Italia, con oltre 8.000 casi dichiarati.

Nel 1964 il vaccino OPV fu introdotto in Italia con un programma di immunizzazione di massa di tutti i bambini da 6 mesi a 14 anni.

- ❖ 1964, SCHEDULA OPV A "TIPI SEPARATI":
 - prima dose: 3° mese di vita (tipo 1);
 - seconda dose: 4° mese (tipo 3);
 - terza dose: 5° mese (tipo 2);
 - prima dose di trivalente: 10°-12° mese;
 - seconda dose di trivalente: 3° anno.

Questa schedula venne utilizzata per la vaccinazione fino agli inizi del 1972 con ottimi risultati: nel 1964 i casi dichiarati di poliomielite in Italia furono circa 3.000, ma già nel 1965 l'incidenza dichiarata si limitava a 500 casi. Nel 1966 la vaccinazione antipolio diventa obbligatoria. A causa della diversa adesione alla campagna vaccinale che si ebbe al Sud rispetto al Nord del Paese, con un'incidenza di infezioni poliomielitiche tre volte superiore al Sud rispetto al Nord nel triennio 1966-68, con legge 4 febbraio 1967 e 25 maggio 1967, il Ministero della Salute rese obbligatoria nel calendario vaccinale la vaccinazione nel primo anno di vita e la rivaccinazione nel terzo anno. Nel 1972 viene modificata la schedula:

- ❖ 1972, SCHEDULA OPV A "TIPI ASSOCIATI" (vaccino orale trivalente bilanciato):
 - prima dose: 3° mese;
 - seconda dose: dopo 6-8 settimane;
 - terza dose: 10°-11° mese;
 - quarta dose: 3° anno di vita.

Nel 1982 si registrarono in Italia gli ultimi due casi autoctoni (due bambini italiani non vaccinati), mentre negli anni successivi si presentarono solo casi occasionali di bambini di origini straniere.

In Italia, dopo aver constatato che 9 dei 10 casi di paralisi conseguenti alla somministrazione del vaccino orale negli anni '90 si erano verificati dopo la prima somministrazione, si modificò la schedula vaccinale introducendo per le prime due dosi il vaccino da virus intramuscolare antipoliomielite ucciso tipo Salk (IPV), mantenendo l'OPV per le ultime due dosi.

- ❖ 1999 (D.M. 7/04/1999), SCHEDULA "SEQUENZIALE MISTA" (IPV-OPV):
 - prima dose: 3° mese (IPV);
 - seconda dose: 5° mese (IPV);
 - terza dose: 11° mese (OPV);
 - quarta dose: 3° anno (OPV).

I risultati con questo schema sono stati molto buoni: dal 1980 al 1994 già con l'uso solo di OPV ci sono stati solo 8 casi di VAPP per anno, mentre dal 1996 in poi quando è stata introdotta la raccomandazione per l'uso dello schema sequenziale i casi di VAPP sono ulteriormente crollati (nel 1997 5 casi di VAPP, nel 1998 1 solo).

Questa schedula venne introdotta per garantire un sufficiente grado di protezione del ricevente evitando, grazie all'impiego di IPV, l'insorgenza di VAPP (1 caso ogni 2,5 milioni di dosi somministrate) la cui probabilità di verificarsi era maggiore del rischio di polioparalisi da virus selvaggio. Infatti il rischio di VAPP è accettabile, entro certi limiti, nelle situazioni in cui è ancora presente il virus selvaggio ma non in quelle in cui la malattia naturale è già stata, proprio per effetto della vaccinazione, eliminata.

La terza e la quarta dose (somministrate dopo la formazione di anticorpi protettivi) erano finalizzate non solo al consolidamento dello stato di immunità (bloccando la replicazione di eventuali virus selvaggi) ma anche al mantenimento di un buon livello di circolazione di virus vaccinale nella popolazione e nell'ambiente (immunizzazione passiva). In questo modo vengono mantenuti i vantaggi legati all'uso di OPV, azzerando quasi del tutto il rischio di VAPP.

Nel 2002 l'Italia, dichiarata "Polio-Free" dall'OMS, insieme al resto dell'Europa Occidentale, abbandonava completamente il vaccino OPV per adottare l'immunizzazione di base con quattro somministrazioni di IPV per decisione della Conferenza Stato-Regioni e del Ministero della Salute. Solo in caso di accensione di un focolaio epidemico si imporrebbe nuovamente l'uso dell'OPV, del quale viene comunque conservata una scorta come misura precauzionale in caso di emergenze e di importazione del virus perché induce una protezione molto più rapidamente del vaccino inattivo (69).

- ❖ 2002, SCHEDULA "TUTTO IPV" TRIVALENTE dato l'approssimarsi della certificazione della Regione Europea. E' tuttora in vigore (Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana, 13/07/2002):
 - prima dose: 3° mese;
 - seconda dose: 5° mese;
 - terza dose: 11°-12° mese;
 - quarta dose: 3° anno di vita.

La Commissione Nazionale Vaccini, un organo consultivo-propositivo del Ministero della Salute, aveva discusso tale passaggio nella seduta del 29 gennaio 2002, formulando un parere a favore dell'utilizzo di una schedula tutta IPV, a patto che venissero rispettate alcune condizioni irrinunciabili:

- corretta sorveglianza delle attività vaccinali per evitare ingiustificati ritardi nel completamento del ciclo primario di vaccinazione (soprattutto relativamente a gruppi a rischio di importazione di poliovirus selvaggi, quali nomadi, immigrati irregolari, rifugiati);
- fornire tempestivamente (entro il 31 marzo di ogni anno) al ministero della Salute i dati delle coperture vaccinali relative ai bambini di età inferiore ad 1 anno;
- sorveglianza della paralisi flaccida acuta;
- costituzione di adeguate scorte di vaccino OPV da impiegare in attività vaccinali mopping-up in caso di necessità (40).

Dal 2005 la somministrazione della 4° ed ultima dose del vaccino è stata spostata dal 3° al 5°-6° anno d'età per permettere l'uso di un vaccino esavalente (anti-tetano/difterite/pertosse/polio), che oltre a proteggere contro la polio (componente inattivata tipo Salk) previene anche la difterite, il tetano, l'epatite virale B, la pertosse e le infezioni invasive da Hib, tutte legate a patologie di difficile curabilità, e che potrebbero altrimenti mettere in serio pericolo la vita o la salute del bambino. La prima vaccinazione viene effettuata al terzo mese, con successivi richiami al quinto e all'undicesimo mese. Per il vaccino anti-polio, tra le dosi deve intercorrere il seguente periodo:

- tra la prima e la seconda almeno 45 giorni;
- tra la seconda e la terza almeno 120 giorni;
- tra la terza e la quarta almeno un anno.

Negli **adulti** la vaccinazione è consigliata se:

- viaggiano in aree/Paesi dove la poliomielite è endemica
- lavorano in laboratori che manipolano prodotti biologici che possono contenere il virus
- si trovano a stretto contatto con persone infette da virus selvaggi
- non sono stati vaccinati e i figli hanno appena ricevuto l'OPV

2.2.8.7 *La vaccinazione dei viaggiatori*

Per i viaggiatori verso le aree endemiche o le aree in cui si ha una ri-circolazione del poliovirus la vaccinazione prevede:

- per i soggetti con ciclo vaccinale di base completo (OPV o IPV), un'ulteriore dose prima della partenza;
- per i soggetti non vaccinati la somministrare di un ciclo primario completo di vaccino (sia OPV che IPV);
- per i soggetti che viaggiano frequentemente, ma per periodi brevi, una dose addizionale dopo il ciclo di base

Invece, i soggetti che vivono in un'area endemica o in un Paese in cui si è verificata la circolazione di poliovirus prima di un viaggio all'estero, dovrebbero aver completato un ciclo di base (preferibilmente con OPV) in modo da stimolare l'immunità mucosale e ridurre il rischio di eliminazione di poliovirus selvaggio (70).

I soggetti, di qualsiasi età e indipendentemente dal proprio stato vaccinale, dovrebbero ricevere un'ulteriore dose di OPV, 1-12 mesi prima di una partenza internazionale (71). In caso di viaggio urgente: un minimo di 1 dose di OPV dovrebbe essere somministrata, idealmente 4 settimane prima della partenza.

Alcuni paesi polio-free come l'Arabia Saudita, possono richiedere (o esigere) ai viaggiatori provenienti da paesi endemici per polio, al fine di ottenere un visto d'ingresso la prova di essere vaccinati stati vaccinati contro la poliomielite almeno 6 settimane prima e/o che i viaggiatori ricevano una dose addizionale al loro arrivo.

2.3 L'ERADICAZIONE DELLA POLIOMIELITE

L'attività di eradicazione ha lo scopo di eliminare l'agente patogeno responsabile della malattia e conseguentemente annullare la comparsa di casi clinici. Nel corso della storia, è la seconda volta che si tenta di eradicare una malattia, dopo il vaiolo nel 1979. Infatti, i virus della poliomielite hanno caratteristiche che li rendono eradicabili:

- l'unico serbatoio naturale è l'uomo, benché anche i primati più in alto nella scala evolutiva possano essere infettati sperimentalmente e talvolta naturalmente
- non esistono portatori cronici o vettori animali che possano perpetuare la circolazione di poliovirus selvaggi. Nelle persone immunocompetenti i poliovirus possono essere rilevati nell'orofaringe per 1-2 settimane, nel sangue per circa 1 settimana, nelle feci per 1-2 mesi dopo l'infezione iniziale; non esiste lo stato di portatore a lungo termine, indipendentemente dal decorso clinico
- Il virus sopravvive nell'ambiente per un breve periodo; i poliovirus presenti nell'ambiente sono diretta conseguenza di infezioni recenti per la polio della comunità umana
- esistono vaccini efficaci che conferiscono una protezione durevole nel tempo

2.3.1 Il programma di eradicazione della Poliomielite

Nel 1988 la poliomielite era largamente endemica in tutto il mondo e si registravano più di 350.000 casi l'anno in 125 Paesi (fig.).

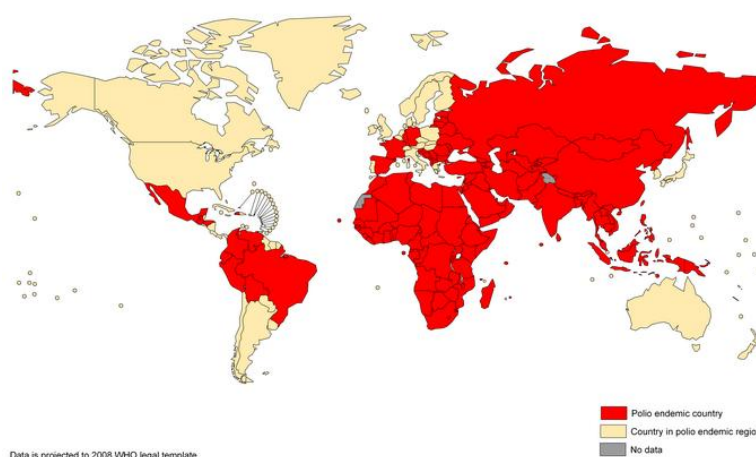


Figura 24. Epidemiologia delle infezioni da poliovirus selvaggio nell'anno 1988 (fonti: OMS)

La gravità della poliomielite nonché le diverse caratteristiche di tale malattia, tra cui l'esistenza di ottimi vaccini, hanno portato nel maggio 1988, la 41^o Assemblea Mondiale della Sanità, costituita dai Ministri della Salute di tutti gli stati membri dell'OMS a stabilire, al meeting annuale di Ginevra, l'eradicazione mondiale della poliomielite quale obiettivo da raggiungere entro la fine dell'anno 2000 (72).

Venne così avviata la “Global Polio Eradication Initiative”, il più grande progetto di Sanità Pubblica finora realizzato, condotta da OMS, Unicef, Banca Mondiale e US Center for Disease Control and Prevention (CDC) in collaborazione con organizzazioni umanitarie e non governative quali la Croce/Mezzaluna Rossa Internazionale e fondazioni private (Rotary International, Rockefeller Foundation e la Bill and Melinda Gates Foundation), riuniti nel GAVI (Global Allied Vaccines Initiative).

Il programma sottolineava che:

- ✓ Il raggiungimento dell’obiettivo dipendeva dalla volontà politica dei Paesi e dall’investimento di adeguate risorse umane e finanziarie
- ✓ La realizzazione dello scopo sarebbe stata facilitata dai continui sforzi dell’Expanded Programme on Immunization per la salute pubblica, dall’incremento della diffusione del vaccino anti-polio e dal miglioramento della sorveglianza clinica e di laboratorio
- ✓ Gli sforzi per eradicare la poliomielite rafforzavano le altre campagne di immunizzazione e gli altri servizi della sanità pubblica, specialmente quelli per le donne e i bambini

Inoltre:

- 1) Invitava gli Stati Membri che avevano una copertura di almeno il 70% a formulare piani per l’eliminazione della trasmissione indigena dei poliovirus selvaggi e sostenere i programmi di immunizzazione nazionale
- 2) Incoraggiava gli Stati Membri che non avevano ancora raggiunto una copertura vaccinale del 70% ad accelerare gli sforzi per ottenere tale livello il più rapidamente possibile, cosa che poteva migliorare e sostenere le altre vaccinazioni incluse nei programmi di immunizzazione nazionale
- 3) Richiedeva agli Stati Membri che avevano confermato l’assenza di casi indigeni di trasmissione di poliovirus selvaggio, di mantenere il proprio traguardo e di offrire supporto e risorse agli altri Paesi che dovevano ancora ottenere tale obiettivo
- 4) Sollecitava tutti gli Stati Membri a:
 - intensificare la sorveglianza per assicurare l’immediata identificazione dei casi di poliomielite e controllare tempestivamente la possibile diffusione del virus e la registrazione dei casi a livello nazionale ed internazionale.
 - Fare tutti gli sforzi possibili per permettere la riabilitazione dei bambini che sono rimasti paralizzati dalla poliomielite
- 5) Infine richiedeva al Direttore generale di:
 - rafforzare le capacità tecniche dell’Organizzazione mondiale della sanità in modo da poter rispondere in modo ottimale alle richieste di collaborazione dei governi
 - promuovere lo sviluppo di nuovi vaccini, altre nuove tecnologie e conoscenze che possono contribuire al raggiungimento dell’eradicazione
 - Cercare altri contributi e risorse per supportare tali attività
 - Stilare regolarmente piani e reports riguardanti gli sforzi nell’eradicazione della poliomielite attraverso l’Executive Board to the Health Assembly, nel contesto dei progressi raggiunti dall’Expanded Programme on Immunization.

2.3.2 Strategie per l'eradicazione

Le strategie attuate per raggiungere l'obiettivo dell'eradicazione della poliomielite sono principalmente:

- ❖ raggiungimento e mantenimento di alte coperture vaccinali mediante la vaccinazione di routine;
- ❖ attuazione di campagne di vaccinazione supplementari, quali le “Giornate Nazionali di Immunizzazione” (NIDs) laddove la vaccinazione routinaria non garantisca alte coperture vaccinali e l'attività di “mopping-up” al verificarsi di casi di sospetta polio;
- ❖ sorveglianza della Paralisi Flaccida Acuta (PFA) ed indagini di laboratorio in strutture accreditate per ricercare i poliovirus selvaggi
- ❖ altre attività di sorveglianza, quale quella ambientale

Il traguardo finale di tali strategie di prevenzione e controllo della malattia è rappresentato dalla “Certificazione dell'eradicazione della poliomielite”. Si tratta di un percorso complesso che vede interagire le Autorità nazionali deputate all'implementazione delle attività di controllo delle malattie infettive, i Comitati Nazionali e Regionali di Certificazione e la Commissione Globale per la Certificazione dell'eradicazione. Infatti la certificazione viene riconosciuta non a livello di singolo territorio o di Stato membro dell'OMS ma a livello di Regione e verrà dichiarata a livello globale soltanto quando tutte le Regioni saranno state certificate. Le Regioni che sono state identificate dall'OMS sono 6:

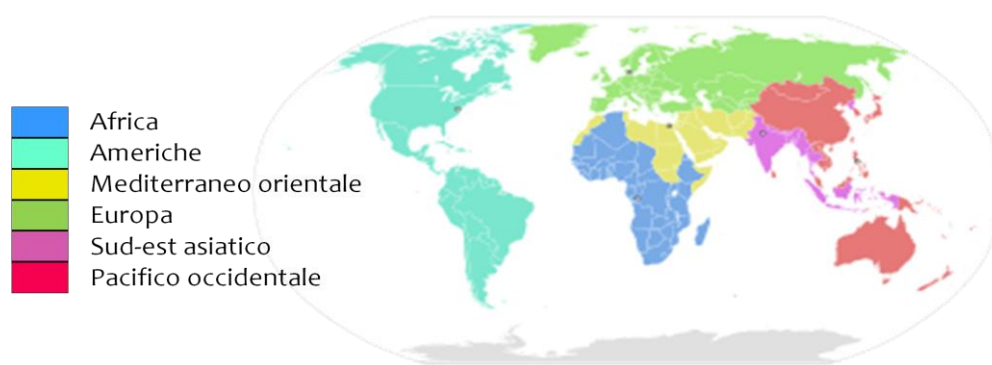


Figura 25. Regioni OMS

2.3.2.1 Copertura vaccinale mediante la vaccinazione di routine

Per il raggiungimento dell'obiettivo di eradicazione è necessario mantenere in tutti i Paesi elevate coperture vaccinali per tutti i nuovi nati di età inferiore a 24 mesi.

I casi di poliomielite verificatisi in questi ultimi venti anni in Regioni dichiarate libere da polio, non sono altro che una conseguenza di carenze nella copertura immunitaria, come nel caso dell'epidemia avvenuta in Olanda nel 1992 in una comunità religiosa che rifiutava le vaccinazioni: in cinque mesi si ebbero 171 casi con 2 morti; i soggetti colpiti avevano un'età compresa tra i quindici e i venti anni. Quattro anni dopo, in Albania, in conseguenza di una campagna vaccinale irregolare e flussi migratori provenienti dalle aree asiatiche endemiche, si verificò un'epidemia che colpì individui tra i dieci e i quaranta anni. Anche nelle più recenti epidemie il gap immunitario ne è almeno in parte la causa, come per l'epidemia della Repubblica del Congo, in cui la maggior parte dei soggetti colpiti erano adulti, e in particolare tra i 15 e i 29 anni. Questi soggetti, infatti, oltre ad avere una bassa immunità naturale dovuta

ad una mancanza di esposizione al virus selvaggio, erano nati e vissuti negli anni in cui i servizi per la vaccinazione erano stati interrotti o irregolari a causa dei disordini civili che sono poi sfociati nella guerra civile (73).

L'evoluzione del quadro epidemiologico e la progressiva scomparsa della poliomielite in ampie aree del mondo ha comportato, nel corso degli anni, cambiamenti nella modalità di attuazione della vaccinazione anti-poliomielite. Infatti l'utilizzo esclusivo di OPV ha consentito l'eliminazione del poliovirus selvaggio dagli USA in meno di vent'anni ed analogamente da altri Paesi industrializzati. Per ridurre ed eliminare il rischio di VAPP è stata dapprima introdotta una schedula mista (IPV e OPV) ed infine una "tutto IPV", tuttora in vigore. Però l'uso esclusivo di IPV causa il progressivo accumulo di soggetti privi di immunità mucosale; ciò potrebbe consentire la circolazione silente di tutti i poliovirus (selvaggi o vaccino-derivati) ed eventualmente provocare anche la comparsa, a causa di mutazioni, di stipti virali biologicamente diversi dai ceppi parentali. Tuttavia l'IPV è l'unico vaccino che potrà essere utilizzato per le fasi conclusive del progetto di eradicazione.

Per accertare che una popolazione abbia una protezione immunologica sufficientemente protettiva verso poliovirus viene svolta la sorveglianza sierologica, mediante la determinazione dei titoli anticorpali con test di neutralizzazione dell'effetto citopatico in micropiastrea. Il titolo può essere calcolato come reciproco della ultima diluizione neutralizzante o come end-point applicando la formula di Karber.

Un soggetto viene considerato coperto dalla vaccinazione se presenta dei titoli anticorpali $\geq 1:8$. Secondo le raccomandazioni dell'OMS una popolazione risulta protetta se almeno il 90% degli individui ha titoli anticorpali sufficienti (74).

In Italia i dati di copertura vaccinale anti-polio a livello regionale riguardanti la popolazione d'età compresa tra 0-14 anni, sono stati ottenuti negli anni 2000/01 e 2007/08.

Lo studio avvenuto nel 2000/01 ha mostrato titoli anticorpali protettivi per tutti e 3 i sierotipi di poliovirus per circa il 98% della popolazione italiana (75). Si notò però una certa discrepanza tra i dati relativi le singole regioni: la prevalenza di individui non protetti oscillava tra il 2% ed il 10% e nel medesimo studio svolto nel 2007/08 venne trovata una grossa falla per la provincia autonoma di Bolzano con il 24.36% di soggetti non protetti verso poliovirus 1, il 25.64% di soggetti non protetti verso poliovirus 2 ed il 32.05% di soggetti non protetti verso poliovirus 3. Un altro dato preoccupante fu ritrovato in Veneto dove, a fronte di livelli raccomandabili di titoli anticorpali verso PV1 e PV2, si registrarono titoli anticorpali verso PV3 solamente per l'83.13% degli individui. Queste situazioni risulterebbero estremamente pericolose se un poliovirus fosse introdotto nel Paese, soprattutto alla luce dei fatti occorsi nel 2010 in Tajikistan.

Nello studio del 2007/08 si notò un decremento del livello nazionale dei titoli anticorpali protettivi rispetto agli stessi dati registrati nel 2000/01:

- +1.7% di individui non protetti verso PV1 con protezione per il 95.6% della popolazione
- +0.4% di individui non protetti verso PV2 con protezione per il 96.2% della popolazione
- +2.1% di individui non protetti verso PV3 con protezione per il 90.6% della popolazione

Anche in questo caso i dati discrepavano da regione a regione. In Lombardia fu confermato il decremento dei titoli anticorpali verso PV1 e PV2 mentre venne registrato un aumento dei titoli verso PV3 rispetto agli stessi dati registrati nello studio 200/01:

- +1.4% di individui non protetti verso PV1 con protezione per il 94.8% della popolazione
- +0.4% di individui non protetti verso PV2 con protezione per il 96.4% della popolazione
- -3% di individui non protetti verso PV3 con protezione per i' 89.22% della popolazione

Secondo i dati del Ministero, le coperture vaccinali in Italia tra il 2000 e il 2011 dei bambini al 24° mese di età (3 dosi di vaccino) risultano variare tra il 95,8 del 2001 e il 96,8 del 2004 (Tabella 7).

Considerando la Regione Europea WHO ad alto rischio di importazione, è chiaro che sia indispensabile il mantenimento di titoli anticorpali protettivi e sistemi di sorveglianza di tali titoli.

Regione	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011
Piemonte	97,2	97,2	96,9	97,1	97,1	97,0	97,2	97,2	96,7	96,5	96,6	95,9
Valle d'Aosta	100,0	99,5	91,5	98,5	99,0	99,5	97,4	96,7	96,4	95,5	95,8	95,6
Lombardia	91,7	97,5	96,5	97,8	98,6	98,3	97,7	96,5	96,4	97,3	97,4	n.p.
Bolzano	97,0	93,3	92,2	92,7	91,1	89,1	89,9	89,1	89,7	88,9	n.p.	n.p.
Trento	98,2	97,8	97,4	96,9	96,7	96,7	96,7	96,8	96,2	96,4	96,2	95,9
Veneto	98,3	98,4	98,2	97,8	97,5	97,2	97,0	97,1	96,8	96,6	95,6	n.p.
FVGiulia	98,0	97,4	97,2	97,5	97,4	97,1	96,5	96,0	95,7	96,2	96,2	96,0
Liguria	99,0	89,5	96,2	96,3	96,3	96,5	95,5	96,5	96,7	96,3	97,6	n.p.
E.Romagna	98,6	98,4	98,0	98,0	97,9	97,7	97,7	97,6	97,4	97,3	96,7	n.p.
Toscana	94,2	86,5	86,8	95,9	96,1	95,2	97,1	96,9	96,9	96,7	96,1	96,2
Umbria	97,7	97,4	97,7	97,2	97,9	97,9	97,5	97,8	97,0	97,3	98,5	n.p.
Marche	97,8	98,9	98,8	98,6	98,0	98,1	98,2	97,5	98,0	97,8	97,2	97,2
Lazio	86,0	86,7	91,4	92,6	96,9	91,1	94,1	98,4	95,8	96,6	97,2	n.p.
Abruzzo	97,5	98,8	n.p.	93,2	98,2	98,1	98,1	97,9	97,9	97,6	97,5	99,0
Molise	96,6	97,5	98,0	96,4	n.p.	98,4	98,5	98,0	98,2	94,6	99,0	n.p.
Campania	92,0	91,5	95,0	94,8	94,9	94,5	94,5	94,5	93,1	94,6	93,4	n.p.
Puglia	99,0	97,2	n.p.	100,0	94,8	99,0	96,2	97,4	96,7	97,0	97,7	n.p.
Basilicata	98,1	99,4	99,4	99,7	97,8	98,9	98,4	99,1	97,6	98,9	98,0	n.p.
Calabria	n.p.	n.p.	97,4	95,0	95,2	94,6	94,0	95,4	94,9	94,5	92,2	95,4
Sicilia	n.p.	95,7	96,0	95,3	95,6	92,9	96,3	n.p.	96,9	95,9	94,3	94,8
Sardegna	98,0	97,3	98,5	98,0	98,4	98,4	98,1	97,9	97,2	96,7	93,0	n.p.
ITALIA	96,6	95,8	95,9	96,6	96,8	96,5	96,5	96,7	96,3	96,1	96,3	96,2

Tabella 7. Coperture vaccinali in Italia per polio.

(Direzione Generale della Prevenzione - Ufficio V - Malattie Infettive e Profilassi Internazionale)

2.3.2.2 Le campagne di vaccinazione supplementare: NIDs e mopping-up

Le attività di immunizzazione supplementare (SIAs) hanno l'intento di svolgere un'azione complementare dell'immunizzazione routinaria. Lo scopo delle campagne di immunizzazione di massa è di interrompere la circolazione dei poliovirus vaccinando ogni bambino sotto i 5 anni di età, con due dosi di OPV, indipendentemente dallo stato di immunizzazione precedente. Queste campagne si sono rivelate molto utili per il conseguimento di elevati livelli di copertura della popolazione, vaccinando anche gli eventuali bambini rimasti scoperti dalla vaccinazione routinaria. Nonostante ciò non possono sostituirsi all'immunizzazione di routine in quanto le coperture nella fascia di popolazione non destinataria dell'intervento, in assenza di vaccinazioni sistematiche, rimarrebbero insufficienti e distribuite in modo disomogeneo. Questa situazione favorirebbe la circolazione dei poliovirus selvaggi e di derivazione vaccinale. Per la sua praticità di somministrazione (due gocce per bocca) viene utilizzato il vaccino orale (OPV) cosa che permette il reclutamento di molti volontari durante queste campagne. Secondo le circostanze possono inoltre essere utilizzati i diversi vaccini orali (mOPV1, mOPV3, bOPV, tOPV) e possono essere inclusi nella vaccinazione anche gli adulti, come nel caso dell'epidemia del Congo.

NIDs

Durante i 3 giorni di cessate il fuoco nel corso della guerra civile di El Salvador, alcuni soldati ribelli vaccinarono circa 250.000 bambini contro il poliovirus: è la prima volta che una guerra viene fermata da un intervento di Sanità Pubblica. Per questo motivo le “Giornate di Immunizzazione” vennero chiamate “Giorni di Tranquillità”. Alla luce di questi successi, negli anni '80 vennero pianificate in America Latina le “Giornate di Immunizzazione Nazionale” (National Immunization Days, NIDs), durante le quali si somministra una dose di OPV in un solo giorno a tutti i bambini (indipendentemente dal loro stato vaccinale) di età inferiore ai 5 anni presenti in una determinata area, generalmente disagiata (ad esempio con scarse condizioni sanitarie, senza elettricità ed eventualmente in guerra). A distanza di un mese viene somministrata la seconda dose. In questo modo si garantisce l'immunità ad intere Nazioni, dato che i bambini non vaccinati si vaccinano, mentre quelli già vaccinati ricevono una dose di richiamo. Inoltre, la popolazione può ricevere indirettamente un richiamo vaccinale grazie all'eliminazione del poliovirus vaccinale da parte dei bambini vaccinati (immunizzazione passiva). L'allestimento è complesso: occorrono una catena del freddo funzionante, medici, volontari, sufficienti dosi di vaccino e fondi.

Nel 1980 il Brasile con la lotta alla poliomielite mediante le “giornate di vaccinazione” raggiunse una rapida disseminazione del virus vaccinale nell'ambiente ottenendo un rapido aumento del livello di immunizzazione nella popolazione e una caduta verticale dei casi di poliomielite. L'adozione di questa strategia nell'America Latina permise di contare l'ultimo caso di malattia in Perù nel 1991.

Dal 1998, durante i NIDs, vengono somministrate anche compresse di vitamina A per rinforzare il sistema immunitario e per proteggere da deficienze come la cecità.

Mopping-up

Il “mopping-up” è un intervento vaccinale focalizzato di contenimento che incrementa l'efficacia dei NIDs e dei sistemi di sorveglianza. Consiste nella vaccinazione (2 dosi) di tutti i bambini con meno di 5 anni in aree dove si sono verificati casi di poliomielite. Generalmente viene effettuato nei Paesi in cui la circolazione del poliovirus selvaggio è interrotta e richiede la pronta disponibilità di scorte di vaccino OPV e di persone che si impegnino nella ricerca “porta a porta” di bambini da vaccinare, affinché non ne venga tralasciato nessuno.

2.3.2.3 La Sorveglianza delle Paralisi Flaccide Acute (PFA)

La Paralisi Flaccida Acuta (PFA) è la manifestazione clinica più evidente dell'infezione da poliovirus. Tuttavia possono essere causa di PFA altre infezioni da virus neurotropi (Echovirus, Enterovirus 71, Coxsachievirus, etc), mielopatie da processi espansivi acuti (tumori, ematomi, ascessi), la mielite trasversa acuta idiopatica, alcune malattie sistemiche (leucemie e linfomi), disordini della trasmissione neuromuscolare su base genetica, alterazioni della muscolatura striata e neuropatie periferiche. Tra queste è particolarmente frequente la sindrome di Guillain Barrè, ma vanno ricordate anche le neuropatie acute demielinizzanti, la neuropatia acuta assonale, le neuropatie in corso di malattie infettive, le neuropatie tossiche (metalli pesanti, farmaci e tossine biologiche).

Per gli scopi della sorveglianza, la Paralisi Flaccida Acuta viene definita come una sindrome ad esordio acuto, caratterizzata da paralisi o paresi degli arti (con possibile concomitante paralisi dei muscoli respiratori e della deglutizione) e da assenza di spasticità o di altri segni di interessamento del SNC (ad esempio, iperreflessia, cloni e segno di Babinski) con raggiungimento del massimo grado di severità in 1-10 giorni.

L'obiettivo della sorveglianza della PFA è pertanto l'individuazione dei casi di polio paralitica da poliovirus selvaggi, mediante la segnalazione immediata di tutti i casi di PFA, dovuti a qualsiasi causa, e l'avvio immediato di indagini di laboratorio condotte da strutture qualificate ed accreditate, riunite in un Network mondiale di Laboratori per la Polio (Global Laboratory Polio Network). Infatti solo grazie agli esiti delle prove virologiche sui campioni di feci di tutti i casi di PFA è possibile attribuire un caso di PFA all'infezione da poliovirus, in quanto la PFA è la manifestazione clinica della poliomielite ma non ne è il segno esclusivo. Per tale scopo è stata istituita nel 1990 la Global Laboratory Polio Network, costituita da 146 laboratori distribuiti in 97 Paesi che utilizzano protocolli standard e che sono sottoposti a esami di accreditamento annuali e costantemente monitorati per il rispetto degli indicatori di qualità.

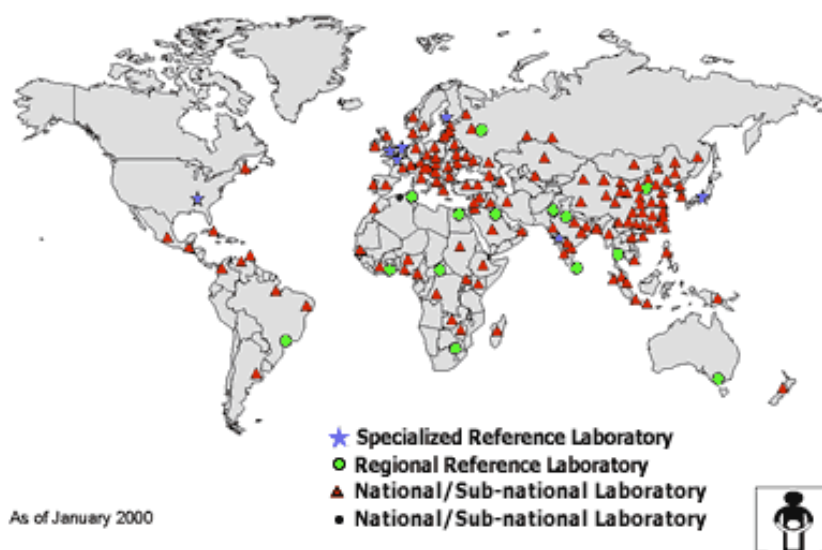


Figura 26. Distribuzione dei 145 laboratori nella Global Laboratory Polio Network

La sorveglianza della PFA è stata ritenuta il mezzo più probabile per trovare poliovirus selvaggi in caso di manifestazioni paralitiche se adeguati campioni clinici vengono raccolti ed analizzati con tempestività dai laboratori.

La sorveglianza della PFA, infatti, è una vigilanza attiva ed è considerata dall'OMS il "gold standard" per la sorveglianza dei poliovirus nelle iniziative di eradicazione, in quanto consente di individuare i poliovirus e di correlarli ad individui noti ed alla comunità a rischio. Si è rivelata importante nel garantire non solo l'individuazione immediata di eventuali focolai di poliovirus selvaggio ma anche di casi di VAPP consentendo di mettere in atto adeguati provvedimenti di Sanità pubblica.

Infatti, il virus circola "silenziosamente" e può contagiare centinaia di persone prima che emerga il primo caso di poliomielite paralitica (si ricorda che la quasi totalità delle infezioni da poliovirus è asintomatica): per questo motivo, l'OMS considera un singolo caso confermato di paralisi da poliovirus come l'evidenza di un focolaio epidemico (72).

Studi epidemiologici condotti in molte aree del globo prima dell'avvio del processo di eradicazione della polio, hanno messo in evidenza tassi di paralisi flaccida acuta oscillanti intorno ad 1 caso per 100.000 soggetti di età compresa tra 0 e 15 anni. Pertanto per individuare rapidamente i casi di polio da importazione e di conseguenza rispondere tempestivamente, il sistema di sorveglianza deve essere sufficientemente sensibile da evidenziare almeno 1 caso di PFA non-polio per 100.000 soggetti di età inferiore a 15 anni.

Questo tipo di sorveglianza si attua, infatti, mediante la segnalazione immediata di tutti i casi di PFA che si manifestino in soggetti di età inferiore a 15 anni nonché di ogni caso di sospetta poliomielite in persone di tutte le età e l'avvio immediato di indagini di laboratorio condotte da strutture qualificate ed accreditate della Global Laboratory Polio Network.

La Commissione Globale di Certificazione (CGC), seguita dai vari RCC, ha stabilito alcuni indicatori di qualità della sorveglianza della polio e della paralisi flaccida acuta e della cosiddetta “performance” di laboratorio, il cui raggiungimento è indicativo dell'efficienza del sistema di sorveglianza delle malattie infettive e delle infrastrutture sanitarie (Tabella 8).

Viene considerato efficiente un sistema di sorveglianza in grado di mettere in evidenza PFA per un tasso pari o superiore ad 1 caso di tale sindrome per 100.000 soggetti di età inferiore a 15 anni ed in cui almeno il 90% delle notifiche dei casi di PFA avvenga entro 7 giorni dall'inizio dei sintomi. La tempestività delle notifiche deve essere pari ad almeno l'80% e le indagini sui casi di PFA andrebbero avviate entro 48 ore dalla segnalazione, con raccolta di almeno due campioni di feci nell'80% dei casi, raccolti entro 14 giorni dall'inizio della sintomatologia e ad almeno 24-48 ore di distanza l'uno dall'altro anche nei casi in cui si escluderebbe immediatamente un'etiologia infettiva (ad es. in caso di trauma o compressione spinale). Le feci devono essere in buone condizioni, ovvero senza segni di perdita all'esterno, o di disseccamento, e con la prova che è stata mantenuta la catena del freddo. Deve essere inoltre eseguito un follow-up di tutti i casi di PFA entro 60 o al massimo 90 giorni dall'esordio della paralisi, al fine di verificare il permanere di paralisi o la restitutio ad integrum del soggetto colpito. Il laboratorio d'analisi deve essere in grado di fornire i risultati entro 28 giorni dal ricevimento dei campioni e, a testimonianza della capacità di identificare virus a trasmissione fecale-orale, in almeno il 10% dei campioni di feci conferiti al laboratorio dovrebbero essere isolati enterovirus non polio.

Indicator	Minimum levels for certification standard surveillance
Completeness of reporting	At least 80% of expected routine (weekly or monthly) AFP surveillance reports should be received on time, including zero reports where no AFP cases are seen. The distribution of reporting sites should be representative of the geography and demography of the country
Sensitivity of surveillance	At least one case of non-polio AFP should be detected annually per 100 000 population aged less than 15 years. In endemic regions, to ensure even higher sensitivity, this rate should be two per 100 000
Completeness of case investigation	All AFP cases should have a full clinical and virological investigation with at least 80% of AFP cases having 'adequate' stool specimens collected. 'Adequate' stool specimens are two stool specimens of sufficient quantity for laboratory analysis, collected at least 24 hours apart, within 14 days after the onset of paralysis, and arriving in the laboratory by reverse cold chain and with proper documentation
Completeness of follow-up	At least 80% of AFP cases should have a follow-up examination for residual paralysis at 60 days after the onset of paralysis
Laboratory performance	All AFP case specimens must be processed in a WHO-accredited laboratory within the Global Polio Laboratory Network (GPLN)

Tabella 8. Indicatori di sorveglianza (3)

Nelle Regione Europa OMS sono 42 i Paesi che svolgono la sorveglianza delle PFA. Ogni rete nazionale ha un suo centro coordinatore, a sua volta collegato in una rete globale gestita dall'OMS (5)

In Italia la sorveglianza della PFA è cominciata nel 1995, anno in cui, con la circolare n. 400.2/28/911 del 7 febbraio 1995 veniva richiesta, a Regioni e Province Autonome, la segnalazione immediata dei casi di PFA, rispondenti alla definizione di caso sopra riportata, con le stesse modalità di notifica richieste per la polio e le altre malattie della Classe I del D.M. 15 dicembre 1990. I risultati nel complesso scarsamente soddisfacenti forniti dal sistema di sorveglianza passivo istituito con la circolare del 7 febbraio 1995, portavano alla determinazione di avviare una sorveglianza attiva della PFA.

Nel 1997 è stato quindi avviato, prima come progetto pilota che coinvolgeva 4 Regioni (Piemonte, Emilia-Romagna, Umbria, Campania) e poi come rete estesa all'intero territorio nazionale, un sistema di sorveglianza costituito da 20 centri regionali di riferimento, per lo più rappresentati da istituti universitari, coordinati dal Laboratorio di Virologia dell'Istituto Superiore di Sanità e dalla Direzione Generale della Prevenzione del Ministero della Salute.

Il Ministero della Salute, in quanto centro coordinatore, si impegna nell'informazione dell'OMS dalla segnalazione iniziale alla classificazione e la diagnosi clinica finale. Secondo i dati del Ministero, dal 1998 al 2011 (per il 2012 i dati non sono ancora disponibili) gli indicatori di performance attesi per i casi di PFA non-polio raramente sono stati raggiunti (Tabella 9) e l'età media dei soggetti era di sei anni.

Il Ministero denuncia quindi una sottotifica dei casi, visibile anche dall'analisi delle schede di dimissione ospedaliera (SDO), in particolare per quanto riguarda la sindrome di Guillain-Barré risulterebbero non segnalati un elevato numero di casi, con una percentuale superiore al 70% negli anni 2009-2010.

Anni	Casi segnalati	Casi attesi	Tasso PFA non-polio	% casi segnalati entro 7 gg	% casi PFA con 2 camp. feci entro 14 gg	% casi PFA indagati entro 48 h	% casi PFA con follow-up a 60-90 gg
1998	60	84	0,66	38%	51%	89%	27%
1999	45	84	0,51	48%	50%	76%	31%
2000	51	83	0,55	52%	61%	76%	33%
2001	77	83	0,91	59%	59%	79%	51%
2002	68	81	0,78	70%	58%	92%	39%
2003	86	81	1,04	64%	64%	86%	52%
2004	75	82	0,87	64%	63%	89%	47%
2005	73	83	0,88	74%	74%	88%	55%
2006	52	83	0,62	90%	65%	85%	56%
2007	63	83	0,75	86%	54%	63%	67%
2008	68	84	0,81	79%	66%	97%	71%
2009	42	84	0,50	86%	69%	88%	55%
2010	53	85	0,62	87%	58%	87%	55%
2011	63	85	0,75	89%	65%	89%	54%

Tabella 9. Sorveglianza delle PFA in Italia 1998-2011: confronto tra casi segnalati e casi attesi e alcuni indicatori

Nonostante la certificazione regionale europea, le attività di sorveglianza non cesseranno, ma dovranno continuare fino alla certificazione globale ed oltre, per avere sufficienti prove e garanzie dell'impossibilità della reintroduzione dell'infezione, prima di potere prendere in considerazione l'ipotesi dell'interruzione delle attività routinarie di vaccinazione antipolio.

2.3.2.4 *La sorveglianza ambientale dei Poliovirus ed altri Enterovirus-non polio (NPEV)*

Il razionale della sorveglianza ambientale si basa sulle caratteristiche di escrezione del poliovirus: ogni individuo infetto (con o senza sintomi) elimina per diverse settimane grandi quantità di poliovirus nelle feci e così nell'ambiente, dove i virus possono mantenere la loro infettività per periodi di tempo variabili a seconda delle condizioni ambientali ma abbastanza lunghi per il loro ritrovamento all'uscita di una rete fognaria (6). Quindi, a differenza della sorveglianza della PFA, non consente un'investigazione focalizzata sull'individuo infetto e sulla sua comunità, ma monitora popolazioni servite da un certo sistema fognario.

La sorveglianza ambientale viene quindi considerata una strategia supplementare a quella della PFA per monitorare la circolazione di poliovirus, selvaggi o di derivazione vaccinale, nella popolazione. Rispetto alla sorveglianza della PFA, ha il vantaggio di individuare poliovirus anche in assenza di casi clinici; infatti l'assenza di paralisi non implica necessariamente l'assenza di circolazione di poliovirus, in quanto nella maggior parte dei casi l'infezione decorre in modo asintomatico o con sintomatologia aspecifica. Ciò consente al virus di diffondersi rapidamente e in modo silente nella comunità, in relazione alle condizioni igieniche ed ambientali e ai livelli di educazione sanitaria e può consentire il contagio di centinaia o anche migliaia di persone prima che emerga il primo caso di polio paralitica. Per questo l'OMS considera un singolo caso confermatodi paralisi come l'evidenza di un focolaio epidemico (3).

Inoltre può fornire utili informazioni laddove si sospetti che la sorveglianza della PFA sia assente o sub-ottimale o che ci siano condizioni di rischio per la popolazione, quali una bassa copertura vaccinale, un rischio di importazione di poliovirus da altri Paesi o evidenze recenti di circolazione di poliovirus selvaggio o vaccino-derivato (6). Infatti, sono soprattutto le situazioni in cui si ha una copertura vaccinale insufficiente ed irregolare, quindi una protezione immunitaria distribuita a macchia di leopardo, a provocare l'emergenza di ceppi di poliovirus di derivazione vaccinale che possono mutare e riacquistare caratteristiche proprie dei ceppi selvaggi, quali la neurovirulenza, un'elevata trasmissibilità interumana e proprietà antigeniche non "vaccine-like" (si ricorda, a questo proposito, l'epidemia di polio-paralisi associata al vaccino verificatasi negli anni 2000-2001 nell'isola caribica di Hispaniola). Quindi è importante che le strategie per l'eradicazione si concentrino non solo sul poliovirus selvaggio ma anche su quello di derivazione vaccinale.

Inoltre è possibile che si verifichi una ricombinazione dei poliovirus con enterovirus non-polio eventualmente circolanti, a causa della forte omologia di alcune regioni del genoma, con conseguente formazione di nuovi virus ibridi e insorgenza di nuovi casi di malattia.

Lo studio di sorveglianza ambientale necessita di metodiche standardizzate affinché i risultati siano confrontabili sia a livello nazionale sia internazionale. A tale proposito, tutti i laboratori accreditati seguono le linee guida dell'OMS (6). Eventuali modifiche alle metodiche raccomandate nelle linee guida vengono condotte in parallelo allo standard e limitatamente ad alcuni aspetti per valutare la possibilità di eventuali variazioni che dovranno comunque essere validate a livello internazionale. La sorveglianza ambientale consiste nella raccolta di campioni ambientali rappresentativi, preferibilmente derivanti da una rete fognaria convergente affinché si possa monitorare un ampio gruppo di individui analizzando i campioni raccolti in un unico sito. Il prelievo deve essere effettuato a monte dell'impianto di trattamento o di collettori principali, anche se il trattamento dei liquami non inattiva completamente il contenuto virale.

Bisogna tenere presente che gli scarichi industriali possono contenere composti tossici per le colture cellulari e/o interferenti con la replicazione del virus.

I siti di campionamento dovrebbero rappresentare popolazioni ad alto rischio di dimensioni di 100.000-300.000 abitanti equivalenti. Se la popolazione considerata è più piccola e i siti di campionamento sono adiacenti, si potrebbero generare campioni composti miscelando porzioni derivate da siti diversi. Invece se è più grande, si avrebbe una riduzione della sensibilità: ciò può essere compensato suddividendo la città in più sottogruppi o aumentando la frequenza di campionamento.

E' significativa la presenza del poliovirus nei campioni di liquame poiché si stima che, su una popolazione di 100.000 persone, un campione di un litro di liquame possa risultare positivo per la presenza del virus se ci sono circa 100 persone nella popolazione che lo eliminano (76).

Inoltre, secondo l'OMS, si dovrebbe rilevare la presenza di enterovirus non-polio in almeno il 30% dei campioni di liquame concentrato e la presenza di ceppi Sabin-like in popolazioni immunizzate con OPV soprattutto dopo i NIDs ed altre campagne.

7 Paesi (Repubblica Ceca, Estonia, Finlandia, Olanda, Russia, Slovenia e Svizzera) svolgono in maniera sistematica la sorveglianza ambientale mediante l'analisi di acque reflue (77).

Ad oggi in Italia i campionamenti sono svolti in solo 9 città distribuite sul territorio italiano (Milano, Parma, Roma, Bari, Palermo, Napoli, Sassari, Bolzano, Venezia), con 5 laboratori accreditati per svolgere le analisi virologiche necessarie (Università degli Studi di Milano, ARPA Venezia, Università di Parma, Università di Roma, ISS).

2.3.3 Storia dell'eradicazione della poliomielite

Finora sono stati raggiunti notevoli successi nonostante non sia ancora stato conseguito l'obiettivo dell'eradicazione, previsto inizialmente per il 2000 e poi rimandato al 2005 e successivamente al 2010:

- ✓ **1985:** l'Organizzazione della Sanità Pan America (Pan American Health Organization - PAHO), considerato il successo dei primi NIDs contro la polio a completamento delle immunizzazioni di routine aveva proposto di eliminare la poliomielite dalla Regione Americana entro il 1990. Il Rotary International lanciò una campagna mondiale per sostenere le agenzie internazionali nell'immunizzazione dei bambini nei Paesi in via di sviluppo: Polio-Plus è il primo settore privato coordinato a livello internazionale che sostiene un'iniziativa di sanità pubblica (40).
- ✓ **1988:** l'Assemblea Mondiale della Salute annunciò l'obiettivo di eradicare la poliomielite dal mondo. Circa 350.000 casi di Polio venivano registrati in tutto il mondo, in oltre 125 Paesi. Il Rotary International annunciò che la campagna di ricerca dei fondi aveva superato le aspettative, raccogliendo 247 milioni di dollari per l'eradicazione della polio.
- ✓ **1990:** al Summit Mondiale per l'Infanzia, OMS, Rotary International, CDC, UNICEF, organizzazioni partner e molti capi di stato confermarono il loro impegno per l'eradicazione della polio. Un'epidemia di polio in Azerbaijan provocò 182 infezioni e 37 in Georgia dal 1990 al 1991. Una forte epidemia provocò oltre 10 000 casi di polio in Cina.
- ✓ **1991:** nella Regione delle Americhe veniva individuato l'ultimo caso di paralisi da polio a Junin in Perù nel mese di agosto: il bambino Luis Fermìn Tenorio Cortez.
- ✓ **1992:** In Olanda, 14 anni dopo l'ultimo caso di poliomielite, si verificò un'epidemia tra popolazioni che avevano rifiutato il vaccino per motivi religiosi. Focolai epidemici venivano confermati anche in Jugoslavia con 12 casi e in Ucraina con 27 casi. La Romania riporta l'ultimo caso di virus indigeno.

- ✓ **1993:** veniva costituita la Commissione Regionale Europea 'Polio Plus' del Rotary International per sostenere le attività di eradicazione nella Regione Europea.
- ✓ **1992-1993:** venne formalmente istituito il “Global Polio Laboratory Network” per favorire l’esecuzione di indagini virologiche di alta qualità in tutti i Paesi.
- ✓ **1994:** il 29 settembre venne raggiunto l’obiettivo di eliminazione della polio nella Regione Americana, trascorsi 3 anni dall’ultimo caso di polio osservato in un bambino di 3 anni nel Nord del Perù. Quella Americana è stata quindi la prima delle sei Regioni designate dall’OMS ad ottenere la certificazione di “Regione polio-free” dalla “Commissione Internazionale per la Certificazione dell’Eradicazione della Polio”. (Tabella 10)

Tabella 10. STATI MEMBRI DELLA REGIONE DELLE AMERICHE (OMS), polio-free dal 1994
 Anguilla, Antigua e Barbuda, Argentina, Bahamas, Barbados, Belize, Bermudas, Bolivia, Canada, Isole Cayman, Cile, Colombia, Costa Rica, Cuba, Dominica, Repubblica Dominicana, Ecuador, El Salvador, Grenada, Guadalupa, Guatemala, Guyana, Haiti, Honduras, Giamaica, Martinica, Messico, Montserrat, Nicaragua, Panama, Paraguay, Perù, St.Kitt, St.Lucia, St. Vincent, Suriname, Trinidad e Tobago, Turks e Caicos, U.S.A., Uruguay, Venezuela, Isole Vergini

- ✓ **1995:** venne lanciata l’operazione MECACAR (Mediterraneo, Caucaso, Repubblica Centro-Asiatica e Russia), uno sforzo senza precedenti per l’eradicazione della poliomielite in 18 Paesi appartenenti a due regioni dell’OMS, Europea e Mediterraneo Orientale (Tabella 11). Questo intervento raggiunse il 92 % di copertura vaccinale: circa 60 milioni di bambini di età inferiore ai 5 anni ricevettero due dosi supplementari di vaccino anti-polio dal 1995 al 1998. Inoltre vennero condotte speciali vaccinazioni di massa “porta a porta” nelle aree a rischio più elevato. Gli ultimi casi di polio indigena venivano individuati in Armenia, Azerbaijan, Kazakistan e Uzbekistan. L’operazione suggerì l’approccio per l’eradicazione della polio: l’OMS adottò in seguito le Giornate di Immunizzazione anche nelle Regioni dell’Africa e del Sud-Est Asiatico.

Tabella 11. OPERAZIONE MECACAR 1995
 Paesi coinvolti appartenenti alla Regione Europea (OMS): Armenia, Azerbaijan, Federazione Russa, Georgia, Kazakistan, Kirghizistan, Tagikistan, Turchia, Turkmenistan, Uzbekistan.
 Paesi coinvolti appartenenti alla regione del Mediterraneo Orientale (OMS): Giordania, Iran, Iraq, Libano, Pakistan, Palestina, Siria

- ✓ **1996:** Nelson Mandela, presidente del Sud Africa e del “Committee for a polio-free Africa”, avviò una campagna intensiva “Kick Polio out of Africa”, al fine di sostenere le immunizzazioni anti-polio di massa nell’intera regione africana.
- ✓ **1997:** In Cambogia veniva trovata paralizzata dalla polio Mum Chanty, una bambina di 15 mesi il 19 marzo: è l’ultimo caso di polio dovuto a virus selvaggio indigeno nella Regione del Pacifico Occidentale. In India, un’epidemia tra i membri di una minoranza religiosa paralizzò 800 bambini.
- ✓ **1998:** In Turchia Melik Minas, un bambino di 33 mesi non vaccinato, è stato trovato paralizzato dalla poliomielite il 26 novembre: è l’ultimo caso di polio dovuto a virus selvaggio indigeno nella Regione

Europea. In Turchia, un'epidemia, provocò 26 casi di poliomielite. Con un'intensa operazione di immunizzazione iniziata ad ottobre e novembre venivano vaccinate popolazioni mai raggiunte prima e si bloccò la trasmissione del virus selvaggio della polio. In India 134 milioni di bambini sono stati immunizzati contro la polio in un solo giorno. I NIDs venivano condotti per la prima volta in Somalia e nel Sudan del Sud.

- ✓ **1999:** L'Assemblea Mondiale della Sanità deliberò all'unanimità la Risoluzione WHA 52.22 per accelerare le attività dell'Iniziativa Globale di Eradicazione. Una forte epidemia colpì l'Angola, paralizzando oltre 100 bambini e provocando 50 morti. Le prime campagne di NIDs venivano intraprese in Congo e Sierra Leone, due Paesi polio endemici in guerra. Da ottobre non venne più isolato il virus selvaggio di tipo 2 mentre il tipo 3 venne isolato nel 2001 solo in India, Pakistan, Somalia e Nigeria.
- ✓ **2000:** il 29 ottobre i 37 Paesi e territori della Regione del Pacifico Occidentale (27% della popolazione mondiale) furono certificati come "polio-free" (Tabella 12). L'ultimo caso si era verificato in Cambogia in una bambina di 15 mesi nel Marzo del 1997. Nel mondo venivano rilevati 2.979 casi di polio dovuti a virus selvaggio, con una riduzione del 99% dal 1998. In diciassette Paesi dell'Africa orientale e centrale venivano vaccinati 76 milioni di bambini nel corso dei NIDs.

Tabella 12. STATI MEMBRI DELLA REGIONE DEL PACIFICO OCCIDENTALE (OMS) POLIO-FREE dal 2000
Australia, Brunei, Cambogia, Cina, Isole Cook, Fiji, Filippine, Guam, Hong Kong, Giappone Kiribati, Laos, Macao, Malesia, Isole Marianne, Isole Marshall, Micronesia, Mongolia, Nauru, Nuova Caledonia, Nuova Zelanda, Nive Palau, Papua Nuova Guinea, Polinesia Francese, Repubblica di Corea, Samoa, Samoa Americana, Singapore, Isole Salomone, Tokelau, Tonga, Tuvalu, Vanuatu, Vietnam, Isole Vallis e Futuna

- ✓ **2001:** Globalmente erano 20 i Paesi polio-endemici all'inizio del 2001. Solo 480 casi di polio dovuti a virus selvaggio della poliomielite venivano riportati in tutto il mondo nel 2001.
- ✓ **2002:** il 21 giugno la Regione Europea, costituita da 53 Paesi (circa 873 milioni di abitanti), venne certificata "polio-free" (Tabella 13). L'eliminazione della poliomielite in Europa venne molto ostacolata dai rivolgimenti politici avvenuti negli anni '90: ai 31 Paesi che facevano parte di questa regione all'inizio del programma anti-polio (inclusa l'Unione Sovietica, ben organizzata nel campo della Sanità Pubblica) se ne aggiunsero 20 derivati dalla disgregazione dell'Unione Sovietica, aventi strutture sanitarie fatiscenti. La Sessione Speciale dell'Assemblea delle Nazioni Unite sull'Infanzia ottenne l'impegno da parte di tutti i governi per l'eradicazione globale entro il 2005. Globalmente, all'inizio del 2002 sono solo 10 i paesi dove la polio rimaneva endemica. Il Rotary lanciò la Campagna di Raccolta Fondi per l'Eradicazione della Polio con l'obiettivo di ricavare 80 milioni di dollari nel corso del 2003. Un buco di 275 milioni di dollari minacciava l'eradicazione globale della poliomielite.

Tabella 13: STATI MEMBRI DELLA REGIONE EUROPEA (OMS), polio-free dal 2002:
Albania, Andorra, Armenia, Austria, Azerbaigian, Belgio, Bielorussia, Bosnia Erzegovina, Bulgaria, Croazia, Danimarca, Estonia, Federazione Russa, Finlandia, Francia, Georgia, Germania, Grecia, Irlanda, Islanda, Israele, Italia, Jugoslavia, Kazakistan, Kirghizistan, Lettonia, Lituania, Lussemburgo, Malta, Monaco, Norvegia, Olanda, Polonia, Portogallo, Regno Unito, Repubblica Ceca, Repubblica di Macedonia, Repubblica di Moldavia, Repubblica Slovacca, Romania, San Marino, Slovenia, Spagna, Svezia, Svizzera, Tagikistan, Turchia, Turkmenistan, Ucraina, Ungheria, Uzbekistan.

- ✓ **2003:** il numero dei Paesi endemici per la poliomielite fu ridotto a sei (Nigeria, India, Pakistan, Niger, Afghanistan ed Egitto). Stesura del Global Polio Eradication Initiative Strategic Plan 2004–2008, che prevedeva l'interruzione della trasmissione del poliovirus entro il 2004-2005, il conseguimento della certificazione globale e garantire la realizzazione della Global Polio Eradication Initiative negli anni 2006-2008 e prepararsi per terminare l'utilizzo dell'OPV (dal 2009 in poi)
- ✓ **2004:** il 15 gennaio a Ginevra i Ministri della Sanità di Afghanistan, Egitto, India, Niger, Nigeria e Pakistan, i sei Paesi ancora endemici per la polio insieme ai partners della Global Polio Eradication Initiative: WHO, Rotary International, Centers for Disease Control and Prevention e UNICEF, si impegnano a intensificare le attività di immunizzazione per fermare la trasmissione del poliovirus entro la fine dell'anno
- ✓ **2005:** i casi di poliomielite nei Paesi precedentemente polio-free sono stati più numerosi rispetto a quelli registrati nei Paesi endemici (1979 rispetto a 856). Vengono introdotti i vaccini monovalenti mOPV1 e mOPV3
- ✓ **2006:** i casi mondiali di polio sono aumentati rispetto al 2005, per l'incremento registrato nei Paesi endemici (1869), che erano scesi a 4: Afghanistan, India, Nigeria e Pakistan. Al contrario i casi nei Paesi non endemici sono diminuiti a 128 (47)
- ✓ **2007:** i casi registrati sono stati globalmente 1315, di cui 1208 relativi a Paesi endemici (874 nella sola India) e 107 a Paesi non endemici (Nepal, Angola, Niger, Chad, DR Congo, Sudan) (28)
- ✓ **2008:** in totale i casi sono stati 1651 e tra questi 1505 provenivano dai 4 Paesi endemici (47). Nel maggio la World Health Assembly (WHA) (3) fu convocata per stabilire una nuova strategia per la completa eradicazione del poliovirus, in virtù del fatto che in quattro Paesi (Afghanistan, India, Nigeria e Pakistan) la trasmissione dell'infezione da polio non era stata ancora interrotta e che risultavano in crescita le aree polio-free in cui si registrava una ripresa della circolazione di polio virus selvaggi (WPV). Il pluriennale protocollo della Global Polio Eradication Initiative (GPEI) fu successivamente sostituito con un programma di lavoro per il solo anno 2009 nel quale:
 - si sarebbero esaminate le maggiori barriere per l'interruzione della trasmissione di WPV in tutte le aree rimaste endemiche
 - sarebbero state accelerate la ricerca e gli studi clinici dei nuovi 4 vaccini (bOPV, mOPV1, mOPV3, tOPV) e delle strategie vaccinali
 - sarebbero stati valutati nuovi approcci per individuare quei bambini sfuggiti alla vaccinazione
- ✓ **2009:** sono stati accertati 1604 casi totali, di cui 1256 relativi a Paesi endemici; anche in questo caso, come l'anno precedente il maggior numero di casi si manifesta in India, 741. (47). Per la prima volta venne brevettato e somministrato il vaccino OPV bivalente (bOPV) il quale produce una risposta immunitaria contemporaneamente verso WPV1 e WPV3 superiore rispetto al vaccino in uso fino ad allora (tOPV) (59).

2.3.4 Situazione mondiale attuale

2.3.4.1 2010

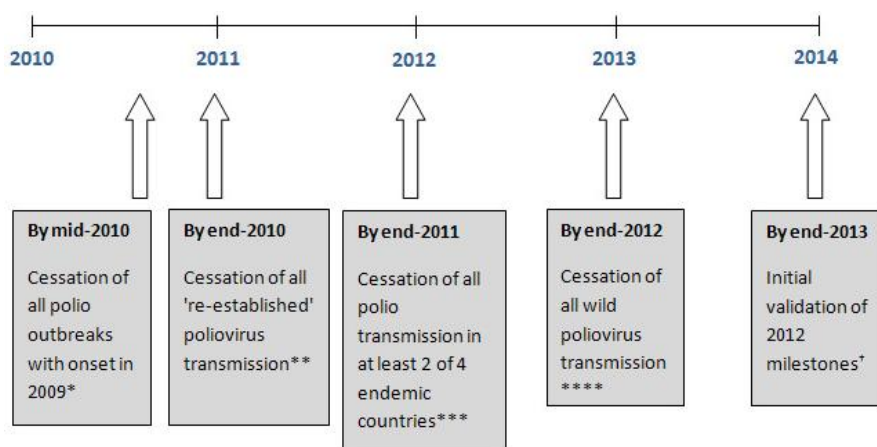
Nel **2010** venne redatto il nuovo manuale di “**GPEI (Global Polio Eradication Initiative Strategic Plan) 2010-2012**” per la sorveglianza e l'eradicazione del poliovirus valido per il biennio 2010-2012. Il documento ha l'obiettivo di dare un nuovo impulso tecnico e finanziario alle attività; si prevede un budget di 2,6 miliardi di dollari per tre anni.

Questo piano, costruito riferendosi a quello del 2009 e unito all'esperienza sviluppata durante tutti gli anni passati aveva tra gli obiettivi (Tabella 14):

1. Interrompere la circolazione di poliovirus selvaggio in Asia e in Africa
2. Migliorare la sorveglianza globale e i tempi di intervento in caso di comparsa di focolai
3. Rafforzare i sistemi di vaccinazione

Nel nuovo protocollo 2010-2012 è stato stabilito, secondo una sequenza temporale ben definita, il raggiungimento dei seguenti target (77):

1. Prima metà del 2010: tutte le epidemie di poliovirus iniziate nel 2009 devono essere interrotte e la trasmissione di polio virus selvaggio in seguito a epidemie successive deve essere fermata entro 6 mesi dalla conferma
2. Seconda metà del 2010: tutte le re-importazioni di poliovirus devono essere interrotte
3. Fine 2011: interrompere la circolazione di poliovirus selvaggio in almeno 2 dei 4 Paesi endemici
4. Fine 2012: interruzione globale della circolazione di poliovirus selvaggio



* validated when >6 months without a case genetically linked to a 2009 importation (i.e. by end-2010).

** validated when > 12 months without a case genetically linked to the re-established virus (by end-2011).

*** validated when > 12 months without a case genetically linked to an indigenous virus (by end-2012).

**** validated when ≥ 12 months without a case genetically linked to an indigenous virus (by end-2013).

† certification will require at least 3 years of zero polio cases in the presence of appropriate surveillance across an entire epidemiologic region.

Tabella 14. Polio eradication targets 2010-2013 (3)

A novembre di quest'anno viene istituito l'Independent Monitoring Board (IMB), che si incarica di valutare i progressi compiuti verso il conseguimento di un mondo libero dalla polio. L'IMB si riunisce su base trimestrale (a partire dal dicembre 2010) per valutare in modo indipendente i progressi verso ciascuna delle tappe più importanti del Piano Strategico della Global Polio Eradication Initiative (GPEI), sulla base dell'epidemiologia e della virologia dei poliovirus e degli indicatori di performance standard e di altri dati (3). Inoltre, l'IMB fornisce valutazioni dei rischi per le lacune di finanziamento esistenti. Se, durante le sue deliberazioni, l'IMB conclude che una delle pietre miliari o un indicatore di processo è 'a rischio' o 'perso', le autorità nazionali competenti e/o i partner dell'attuazione/donatori si impegnano a elaborare piani d'azione correttivi di emergenza. Nelle riunioni successive, l'IMB valuterà la qualità, l'attuazione e l'impatto di tali piani d'azione correttivi.

L'IMB è composto da esperti di livello mondiale provenienti da diversi settori inerenti al lavoro del GPEI, ed è stato istituito su richiesta del Consiglio di Amministrazione (EB) e l'Assemblea Mondiale della Sanità (WHA). Relazioni trimestrali degli incontri del Consiglio di Amministrazione vanno direttamente ai capi delle agenzie partner - l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS), Rotary International, i Centri statunitensi per il Controllo delle Malattie e la Prevenzione (CDC) e l'UNICEF - e la Bill and Melinda Gates Foundation e sono pubblicati poco dopo.

Nel 2010 si osservano diversi progressi (78) tra cui:

- un numero di casi del 19% inferiore rispetto a quello riportati al 2009
- l'interruzione di tutti gli outbreak iniziati nel 2009
- il numero più basso mai riportato di casi causati dal poliovirus selvaggio di tipo 3 (WPV3) a livello globale, con una riduzione del 92%
- la riduzione $\geq 94\%$ dei casi in India e Nigeria rispetto al 2009

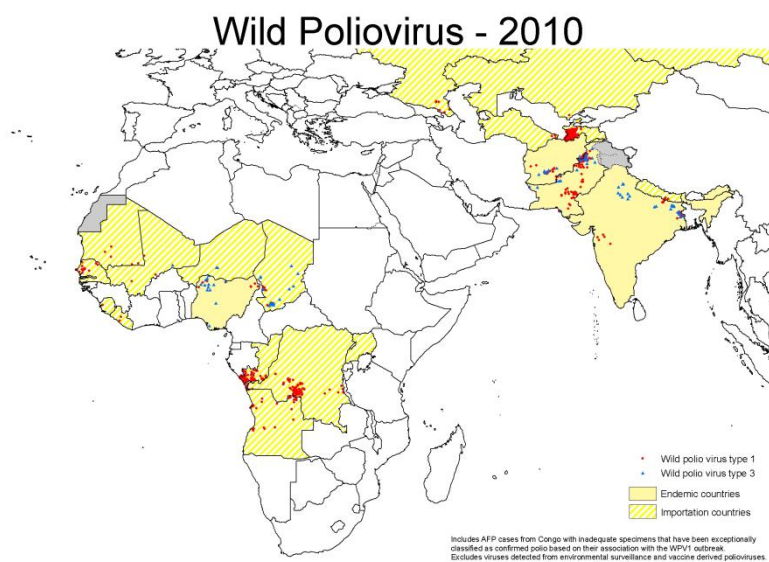


Figura 27. Casi di poliomielite causati da poliovirus selvaggio nel 2010 (3)

Nel 2010 si registravano nel mondo 1352 casi di poliovirus selvaggio e i Paesi che risultavano essere endemici per la poliomielite erano ancora 4 (Afghanistan, India, Nigeria e Pakistan), nei quali si sono verificati 232 (17%) dei 1.352 casi, di cui: 42 in India, 21 in Nigeria, 25 in Afganistan e 144 in Pakistan (Tabella 15) (3). Dei restanti casi, 159 casi (12%) si riportavano nei Paesi in cui si era ristabilita la trasmissione di poliovirus selvaggio: Angola, Ciad e nella Repubblica Democratica del Congo e 900 (71%) si registravano in 13 altri Paesi (Kazakistan, Liberia, Mali, Mauritania, Nepal, Niger, Repubblica del Congo, Federazione Russa, Senegal, Sierra Leone, Tagikistan, Turkmenistan, Uganda) inclusi 2 nei quali il focolaio era insorto nel 2009 e 11 di nuova importazione. Nonostante la trasmissione del WPV3 sia diminuita del 92%, quella del WPV1 ha subito un incremento del 145% (78). Nel 2010 le epidemie in Tagikistan e Congo comprendono i due terzi (901) di tutti i casi del 2010.

	WPV ₁	WPV ₃	All WPV
Polio-endemic countries	163	69	232
Afghanistan	17	8	25
India	18	24	42
Nigeria	8	13	21
Pakistan	120	24	144
Countries with reestablished transmission	144	15	159
Angola	33	—	33
Chad	11	15	26
Democratic Republic of the Congo	100	—	100
Countries affected by outbreaks	897	3	961
Kazakhstan	1	—	1
Liberia	2	—	2
Mali	3	1	4
Mauritania	5	—	5
Nepal	6	—	6
Niger	—	2	2
Republic of Congo	441	—	441
Russian Federation	14	—	14
Senegal	18	—	18
Sierra Leone	1	—	1
Tajikistan	460	—	460
Turkmenistan	3	—	3
Uganda	4	—	4
Total	1.265	87	1.352

Tabella 15. distribuzione dei casi di poliovirus selvaggio (1 e 3) nel 2010 nei diversi Paesi del mondo

Al 2010 la copertura vaccinale globale con le tre dosi vaccino orale trivalente nei bambini di 12 mesi era dell'86%, e variava nelle diverse Regioni OMS (79):

- 79% nella Regione Africana
- 93% in the Region of the Americas
- 96% in the European Region and Western Pacific Region
- 77% in the South-East Asia Region

La copertura vaccinale tende comunque a variare da Paese a Paese e a livello sub-nazionale (80).

Nel 2010 si sono svolte in totale 309 SIAs in 49 Paesi, utilizzando i vaccini orali, di cui: 130 NIDs, 140 SNIDs, 11 child health days e 28 mop-up. Di queste 87 (28%) sono state condotte nei quattro Paesi endemici (38 in India, 20 in Pakistan, 12 in Afghanistan, e 17 in Nigeria), 94 (30%) nei Paesi polio-free in cui si è verificata l'importazione di poliovirus selvaggio, 56 (18%) nei Paesi in cui si è ristabilita la trasmissione di poliovirus (Angola, Chad, DRC, and Sudan), and 72 (23%) nei Paesi senza circolazione di polio virus selvaggio nel 2010 (78). È stato stimato che 2,21 miliardi di dosi di OPV sono state somministrate a circa 400 milioni di persone, la maggior parte dei quali erano bambini di età inferiore ai 5 anni. Delle dosi somministrate circa il 33% era rappresentato dal vaccino trivalente, il 23% era il monovalente contro il tipo 1, il 4% il monovalente contro il tipo 3 e il 40% il bivalente contro l'1 e il 3 (78).

Per quanto riguarda la sorveglianza delle paralisi flaccide acute a livello nazionale il tasso di 1 caso ogni 100.000 soggetti di età inferiore ai 15 anni per ciascun Paese è riportato in figura 28.

Dei 20 Paesi in cui si è verificata la circolazione di poliovirus selvaggio nel 2010, 13 (65%) hanno raggiunto il tasso atteso di 2 casi di paralisi flaccida acuta non causati da poliovirus ogni 100.000 bambini di età inferiore ai 15 anni ed è stata ottenuta una percentuale $\geq 80\%$ di casi con adeguati campioni di feci; solo 12 di questi Paesi (60%) avevano almeno il 50% delle province o degli Stati che avevano raggiunto entrambi gli obiettivi (81).

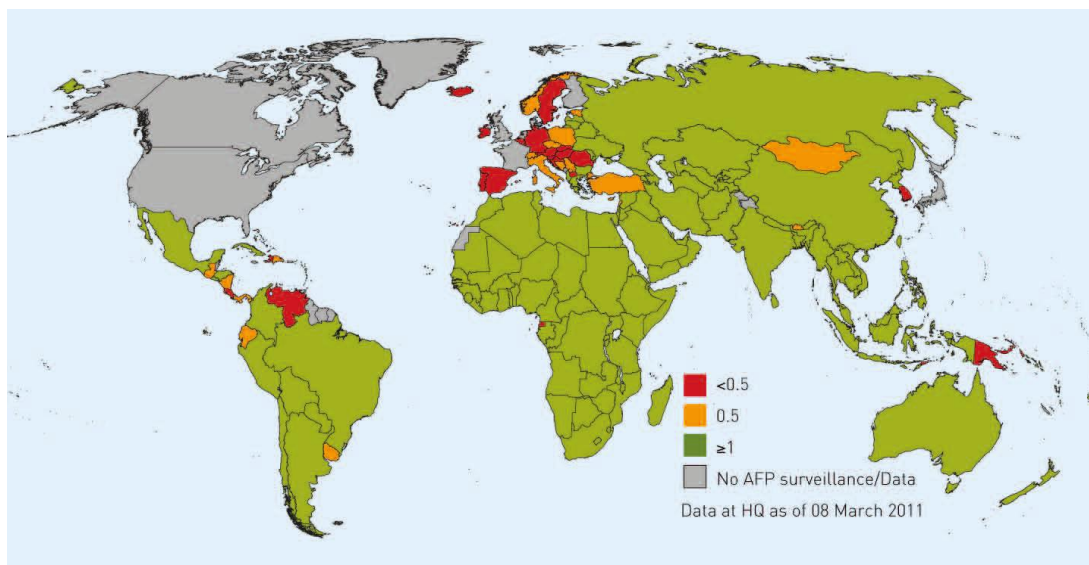


Figura 28. Sorveglianza delle PFA nel mondo, 2010 (Fonte: Annual Report GPEI, 2010)

2.3.4.1.1 Epidemia del Tagikistan

Particolarmente degna di nota è l'epidemia del Tagikistan del 2010 che segna la prima importazione di poliovirus selvaggio nella Regione Europea dalla sua certificazione come polio-free nel 2002. Prima di questa segnalazione, l'ultimo caso di poliomielite confermato in Tagikistan risale al 1997 e il Paese riportava nel 2008 una copertura vaccinale con OPV dell'87%.

L'epidemia è conseguente all'introduzione di un singolo poliovirus selvaggio nella Regione Europea e il sequenziamento virale ha stabilito che il virus responsabile è un poliovirus selvaggio di tipo 1 (WPV1) geneticamente più vicino a un ceppo recentemente isolato in Uttar Pradesh, India, Paese allora endemico [wep 25 ott 2010].

Oltre al Tagikistan questa epidemia ha visto coinvolti altri 3 Stati Membri della Regione Europea in cui il virus si è diffuso: Federazione Russa, Turkmenistan e Kazakistan.

L'epidemia è legata alla mancata tempestività nell'invio dei campioni per le analisi virologiche dei primi casi di paralisi che ha ritardato il riconoscimento dell'eziologia da poliovirus (82); il ritardo nella messa in atto di interventi vaccinali straordinari, ha permesso che la circolazione del poliovirus importato dall'India continuasse, determinando 475 casi di poliomielite, di cui 457 in Tagikistan e 18 in 3 Paesi confinanti: 14 nella Federazione Russa, 3 in Turkmenistan e 1 in Kazakistan (Figura 29).

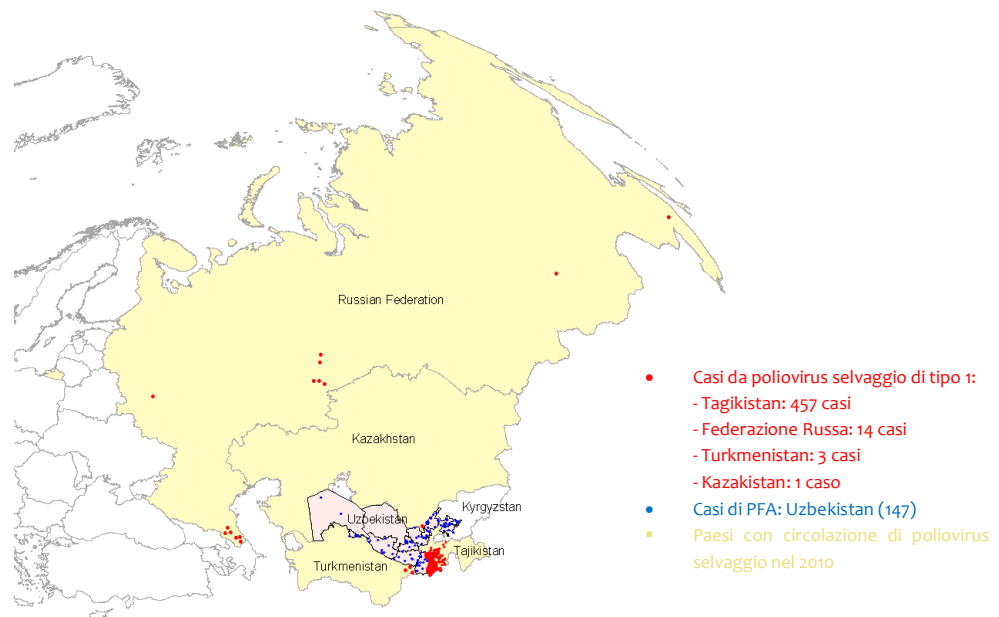


Figure 29. Distribuzione dei casi di poliovirus selvaggio nella Regione Europea nel 2010 e dei casi di paralisi flaccida acuta in Uzbekistan (83)

Dei 457 casi in Tagikistan confermati in laboratorio essere causati da poliovirus selvaggio, la maggior parte (più di 220 casi – circa il 49%) erano bambini tra i 1 e 5 anni. Il numero totale dei casi include anche 29 decessi (6.3%) (84), di cui 4 erano bambini di età inferiore a 1 anno, 12 erano bambini tra i 1 e 5 anni, 10 avevano un'età compresa tra i 6 e i 14 anni e 3 avevano un'età maggiore o uguale a 15 anni (84)

L'identificazione e il controllo dell'epidemia sono stati successivamente resi possibili dall'intensa attività di sorveglianza delle Paralisi Flaccide Acute, grazie alla quale è stato possibile verificare, tramite le adeguate indagini di laboratorio, i casi di paralisi causati da poliovirus selvaggio. Nel 2010 i casi di paralisi flaccida acuta indagati sono stati: (85)

- 712 in Tagikistan, di cui 457 causati da poliovirus selvaggio di tipo 1
- 113 in Kazakistan, di cui un caso causato da poliovirus selvaggio di tipo 1
- 409 PFA nella Federazione Russa, di cui 14 sono stati confermati dal laboratorio come causati da poliovirus selvaggio di tipo 1
- 50 in Turkmenistan, di cui 3 causati da poliovirus selvaggio di tipo 1
- 68 PFA in Kirgikistan, di cui nessuno causato da poliovirus selvaggio
- 147 PFA in Uzbekistan, di cui nessuno causato da poliovirus selvaggio

L'epidemia è stata inoltre controllata grazie alle attività di immunizzazione supplementare (SIAs) mediante l'utilizzo del vaccino monovalente per il poliovirus 1 (mOPV1) e del trivalente (tOPV). Nel 2010 le SIAs sono state messe in atto nei 6 Paesi con più di 45 milioni di dosi somministrate (mOPV1, tOPV) (Tabella 16) (86).

Gli stessi Paesi hanno sviluppato piani di immunizzazione anche per il 2011 per assicurare il mantenimento di un'attività di sorveglianza ottimale e assicurare la vaccinazione contro la poliomielite di tutti i bambini (85).

Country	Round	Type of SIA	Dates	Vaccine*	Target Age Group	Target Pop size	Administrative Coverage†
Kazakhstan	I	NIDa	06-10 Sept	1OPV	< 5 years	1 888 727	98.0%
	II	SNIDa	1-10 Nov	mOPV1	< 15 years	2 200 000	Not reported
Kyrgyzstan	I	NIDa	19-23 July	mOPV1	< 5 years	670 165	95.2%
	II	NIDa	23-27 Aug	mOPV1	< 5 years	670 165	95.5%
Russian Fed.	I	SNIDa	27 Oct-3 Nov	1OPV	6 mos-15 years	2 325 000	99.0%
	II	SNIDa	29 Nov - 3 Dec	1OPV	6 mos-15 years	2 200 000	99.7%
Tajikistan	I	NIDa	04-08 May	mOPV1	< 6 years	1 090 000	99.4%
	II	NIDa	18-22 May	mOPV1	< 6 years	1 090 000	99.4%
	III	NIDa	01-05 June	mOPV1	< 15 years	2 673 741	98.8%
	IV	NIDa	15-19 June	mOPV1	< 15 years	2 673 741	99.3%
	SNID	34 districts	13-17 Sep	mOPV1	< 15 years	1 788 900	99.2%
	V	NIDa	04-08 Oct	1OPV	< 15 years	2 673 741	98.8%
Turkmenistan	VI	NIDa	08-12 Nov	1OPV	< 15 years	2 673 741	98.8%
	I	NIDa	12-16 July	1OPV	< 5 years	579 483	98.9%
	SNID	NA	28 July-06 Aug	1OPV1	< 25 years	1075433	95.5%
	II	NIDa	26 Aug-05 Sept	mOPV1	< 15 years	1 476 980	99.8%
Uzbekistan	III	NIDa	20-29 Sept	mOPV1	< 15 years	1 488 830	99.8%
	I	NIDa	17-21 May	mOPV1	< 5 years	2 850 000	100.8%
	II	NIDa	07-11 June	mOPV1	< 5 years	2 850 000	100.4%
	SNID	7 districts	25-26 Jul	mOPV1	< 25 years	419 000	91.8%
IV	NIDa	25-31 Oct	mOPV1	< 15 years	9 003 262	98%-99%	

Tabella 16. SIA nei sei Paesi colpiti dall'epidemia (data reported as of 23 December 2010) (85)

Per coprire eventuali gap immunitari rimasti e per prevenire l'eventuale trasmissione di poliovirus selvaggi oltre i confini, come si è verificato nel caso dell'epidemia in Tagikistan, sono state condotte attività di immunizzazione supplementare contro la poliomielite nella prima metà del 2011 (87). Per la prima volta dopo l'operazione MECACAR (1995-2007), 7 Paesi hanno condotto SIA sincronizzate: Kirghizistan, Tagikistan, Turkmenistan and Uzbekistan hanno condotto due round di SIA a livello nazionale, entrambi utilizzando il vaccino trivalente; il Kazakistan e la Federazione Russa hanno condotto due round di SIA a livello subnazionale per fermare la trasmissione di poliovirus selvaggio in territori ad alto rischio: il Kazakistan con il vaccino monovalente di tipo 1 e la Federazione Russa con il trivalente. Il Kazakistan ha inoltre completato un round con una campagna di immunizzazione nazionale con il tOPV. In Azerbaijan si sono svolti due round di SIA a livello sub-nazionale con il vaccino trivalente, in distretti al confine con la Federazione Russa.

In totale più di 18 milioni di bambini sono stati vaccinati contro la poliomielite durante i 15 round delle SIA, cosa che ha permesso il raggiungimento di ottimi livelli di copertura vaccinale in quei Paesi.

L'ultimo caso nella Regione Europea proveniva dalla Federazione Russa ed è stato registrato il 25 settembre 2010. Da allora sono stati riportati più di 2.400 casi di paralisi flaccida acuta, nessuno dei quali è risultato essere causato da poliovirus selvaggio (Figura 30) (88).

Lo stato polio-free della Regione Europea è stato confermato dall'European Regional Certification Commission for Poliomyelitis Eradication in occasione dell'incontro a Copenhagen il 23-24 agosto 2011 (88). Tenendo conto dello stato di controllo e di sorveglianza della Regione la Commissione ha riconosciuto l'interruzione della trasmissione del poliovirus selvaggio e che lo stato della Regione Europa è stato mantenuto e la Regione non necessita di una ri-certificazione.

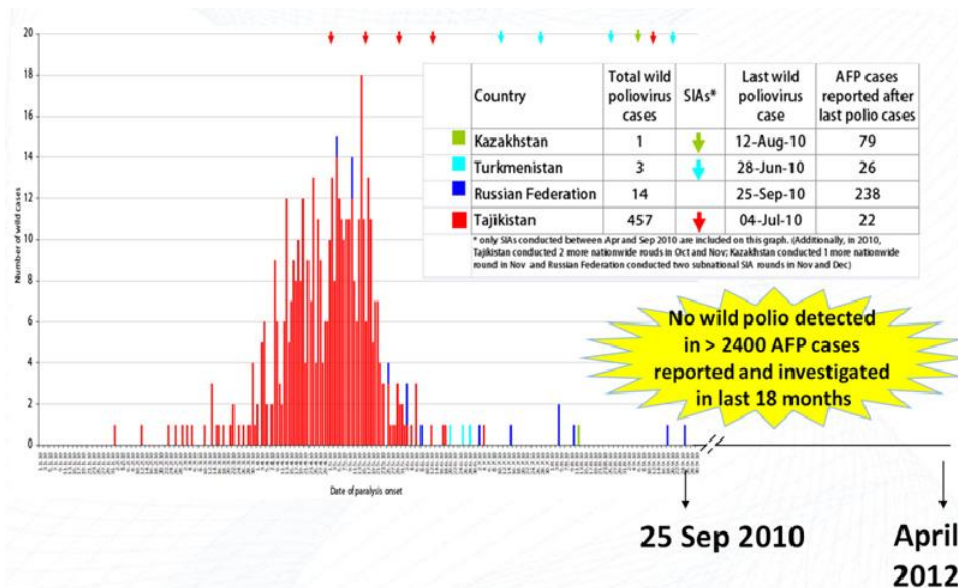


Figura 30. Epidemia del Tagikistan del 2010: casi confermati e SIA (aprile-settembre 2010).
L'ultimo caso di paralisi da poliovirus selvaggio osservato e i casi di paralisi registrati con la sorveglianza dopo l'ultimo caso (88)

2.3.4.1.2 Epidemia della Repubblica del Congo

Un'altra epidemia del 2010 è quella che riguarda il Congo. A ottobre del 2010 un neurologo notò un eccessivo numero di casi di paralisi flaccida acuta tra adulti e il 4 novembre è stato confermato il primo caso di poliomielite causato dal poliovirus selvaggio di tipo 1 osservato nella città portuale di Pointe Noire (89). Era dal 2002 che nella Repubblica del Congo non si registravano più casi da poliovirus selvaggio. Il poliovirus isolato era geneticamente correlato con un poliovirus selvaggio isolato in Angola nel 2010. Successive indagini, inclusa la ricerca attiva dei casi, hanno rivelato un aumento del numero dei ricoveri ospedalieri per paralisi flaccida acuta già agli inizi del mese di settembre. I ricoveri settimanali aumentarono da circa 10 casi agli inizi di ottobre a 80 alla fine di ottobre e novembre. Grazie alle attività di immunizzazione i ricoveri settimanali scesero a meno di 5 alla fine di dicembre.

Il primo caso di polio risale, infatti, al 19 settembre 2010 a Pointe-Noire (73). Da quella data al 22 gennaio 2011, in cui è stato registrato l'ultimo caso, sono stati osservati 445 casi di poliovirus selvaggio nella Repubblica del Congo, di cui la maggior parte (390 casi) a Pointe-Noire (73)

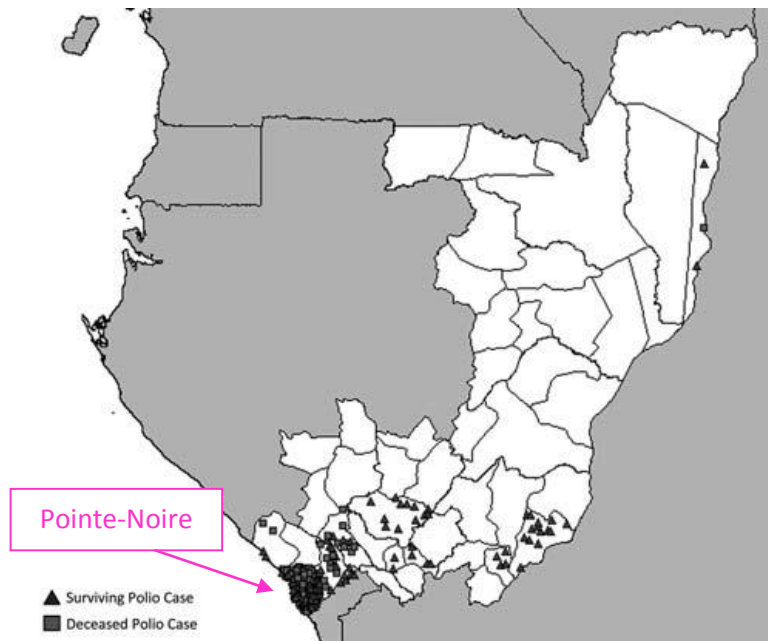


Figura 31. Distribuzione dei casi di poliomielite nei diversi distretti della Repubblica del Congo

Questa epidemia si è distinta per l'elevato numero di casi tra gli adulti (331/445) e l'alto tasso di mortalità (43%, 193/445) (73). L'età media dei casi era di 20 anni (range: 0,6-63 anni); in particolare 265 (60%) sono nati tra il 1984 e il 1995 (73). Lo stato vaccinale era mancante per il 78% dei casi (348) e dei 97 casi di cui questo era disponibile, 54 (56%) non erano stati vaccinati oppure avevano ricevuto meno dosi rispetto a quelle previste (73).

Solamente in pochi casi è stato possibile analizzare i campioni di feci come previsto dagli standard mondiali per la conferma dei casi di polio, mentre per gli altri è stato applicato l'algoritmo per la classificazione clinica dei casi di paralisi flaccida, impiegato l'ultima volta nei Paesi della Regione OMS Africana nel 2000, e che viene solitamente utilizzato quando i campioni di feci sono disponibili per meno del 65% dei casi (90).

I sintomi e le caratteristiche cliniche sia dei casi confermati in laboratorio che di quelli clinicamente diagnosticati erano simili, eccetto per un'elevata percentuale di pazienti con 3 o 4 arti coinvolti nella paralisi nel caso dei pazienti di cui erano stati analizzati i campioni biologici (73). I dati disponibili non hanno permesso di determinare se la paralisi fosse bulbare.

Dei 445 casi riportati 64 sono stati confermati dalle analisi di laboratorio, 378 sono stati confermati clinicamente e 3 sono stati classificati come clinicamente compatibili con la polio (73). Casi correlati geneticamente sono stati riportati nel Gabon, nella Repubblica Democratica del Congo e in Angola.

L'88% dei casi di poliomielite (390/445) nella Repubblica del Congo sono stati registrati a Pointe-Noire (Figura 31) e si differenziano a livello epidemiologico dal resto della Repubblica del Congo, in particolare per l'elevato tasso di mortalità osservato del 47% (182/390) rispetto al 20% nel resto della Repubblica del Congo e per l'età media dei casi che a Pointe-Noire era di 20 anni rispetto ai 9 del resto del Paese. I pazienti di Pointe-Noire però non si distinguevano per le caratteristiche cliniche, che erano le stesse osservate in tutti i casi, inclusi: febbre, paralisi asimmetrica e paralisi di 4 arti.

Nella Repubblica del Congo sono stati registrati 611 casi di paralisi flaccida acuta dal 1 gennaio 2010 all'8 maggio 2011 (Figura 32).

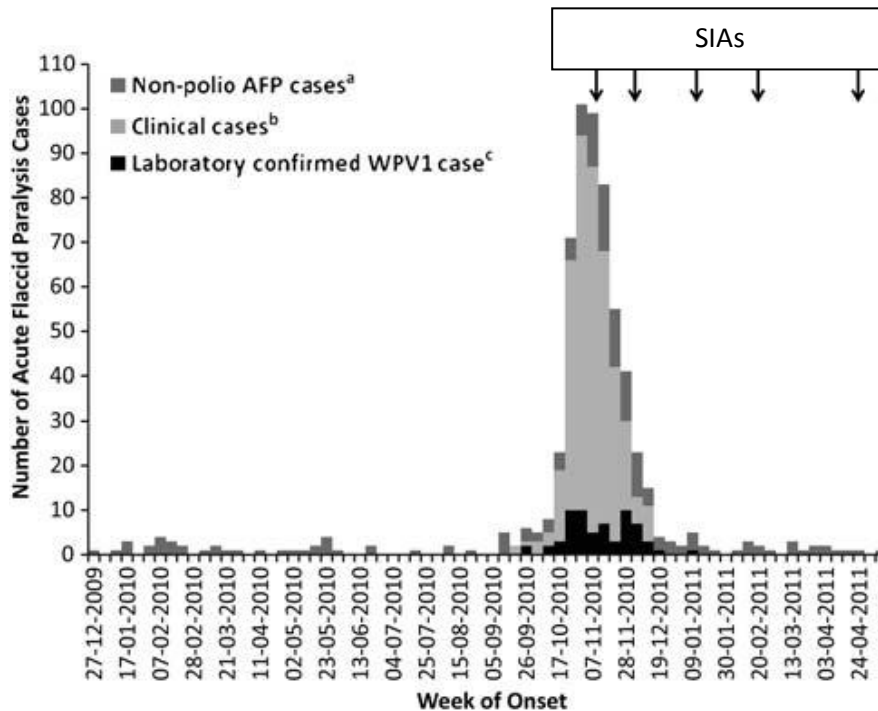


Figura 32. Classificazione della National Poliomyelitis Expert Committee (NPEC) dei casi di paralisi flaccida acuta della Repubblica del Congo (73)

L'epidemia è stata controllata grazie all'attività di immunizzazione supplementare nazionale (4 round) che, visto l'elevato numero di casi tra gli adulti, coinvolgevano l'intera popolazione, intraprese con il primo round il 12-16 novembre e che prevedevano l'uso del vaccino orale monovalente per il tipo 1 (89). Le SIA successive sono state condotte: 3-7 dicembre 2010 utilizzando il vaccino orale monovalente per il tipo 1; 11-15 gennaio 2011 utilizzando il vaccino orale bivalente per i tipi 1 e 3 e 22-26 febbraio 2011 bivalente. Le prime tre SIA sono state coordinate con le regioni vicine dell'Angola e della Repubblica Democratica del Congo dove sono stati registrati successivamente dei casi, mentre la quarta SIA con il Gabon, dove è stato confermato un caso a gennaio (89). Una SIA sub-regionale, che prevedeva l'utilizzo del bOPV, ha avuto luogo ad aprile e coinvolgeva sette distretti della Repubblica del Congo, tra cui Brazzaville e Pointe-Noire ed è stata sincronizzata con Gabon, Angola, Namibia e La Repubblica Democratica del Congo (73)

Diversi fattori hanno contribuito all'istaurarsi di questa epidemia nel Congo, tra cui la bassa copertura vaccinale tra i giovani adulti a causa dei disordini civili negli anni 1993-2003, inclusa la guerra civile del 1997-1999 e un periodo prolungato di assenza di circolazione del poliovirus selvaggio di tipo 1 in quest'area (73).

Secondo un recente studio (91) sull'elevato tasso di mortalità osservato nei casi di Pointe-Noire, questo tasso è risultato associato a diversi fattori, inclusa l'età, le dimensioni della casa, per cui più sono piccole maggiore è il rischio e l'uso di pozzi come fonte di acqua potabile durante un periodo di carenza di acqua.

2.3.4.2 2011

Sebbene durante il 2010 sono stati riscontrati diversi progressi per l'eradicazione della polio, l'IMB, vista la situazione attuale, nell'incontro del 30 giugno-1 luglio a Londra giudica "a rischio" il raggiungimento del traguardo dell'interruzione della trasmissione dei poliovirus selvaggi attesa per il 2012 poiché (92):

- ✓ il programma di eradicazione ha uno scarso controllo della poliomielite nei paesi in cui la trasmissione è stata ristabilita (Angola, Ciad e nella Repubblica Democratica del Congo);
- ✓ il programma non è in grado di anticipare e prevenire le epidemie in paesi ad alto rischio precedentemente liberi da polio; 14 paesi hanno avuto tali focolai dall'inizio del 2010;
- ✓ il numero di casi di poliomielite in Pakistan nel 2011 è raddoppiato rispetto allo stesso periodo del 2010;
- ✓ l'urgenza e la potenza delle risposte fornite dal programma per la situazione in Ciad e nella Repubblica Democratica del Congo non sono state commisurate alle gravi carenze di capacità, prestazione e di controllo della qualità di questi paesi;
- ✓ ci sono troppi esempi di fallimento per garantire costantemente campagne di vaccinazione di alta qualità e la sorveglianza nelle principali aree geografiche

Secondo l'IMB ottenere l'obiettivo di eradicazione entro il 2012 previsto dal piano strategico 2010-2012 (77) è ancora attuabile a breve termine se vi è un maggiore impegno politico, la sicurezza dei finanziamenti e maggiori capacità tecniche (92).

L'IMB rimane dell'idea che fermare la trasmissione di poliovirus è un problema di sanità pubblica mondiale. Il mancato raggiungimento di questo obiettivo permetterà alla polio di riaffermarsi.

Durante quest'anno però un importante obiettivo è stato raggiunto: in India, il 13 gennaio 2011 si registra l'ultimo caso di infezione da poliovirus selvaggio relativo ad una bambina di due anni infettata nello Stato del Bengala occidentale. Si tratta di un risultato molto importante che segna un passo avanti verso l'eradicazione della poliomielite e che potrebbe determinare nel 2014 la dichiarazione della Regione del Sud-est asiatico come polio-free.

Questo traguardo è stato raggiunto grazie a diversi approcci attuati dal governo e dai partners, inclusi: 1) una vasta mobilitazione umana e di risorse finanziarie per aumentare la copertura vaccinale con le SIA dei bambini nelle aree endemiche ad alto rischio e nella popolazione migrante, 2) l'introduzione del vaccino bivalente, 3) miglioramenti nella copertura vaccinale di routine e 4) rapide risposte ai nuovi outbreak (80).

Wild Poliovirus - 2011

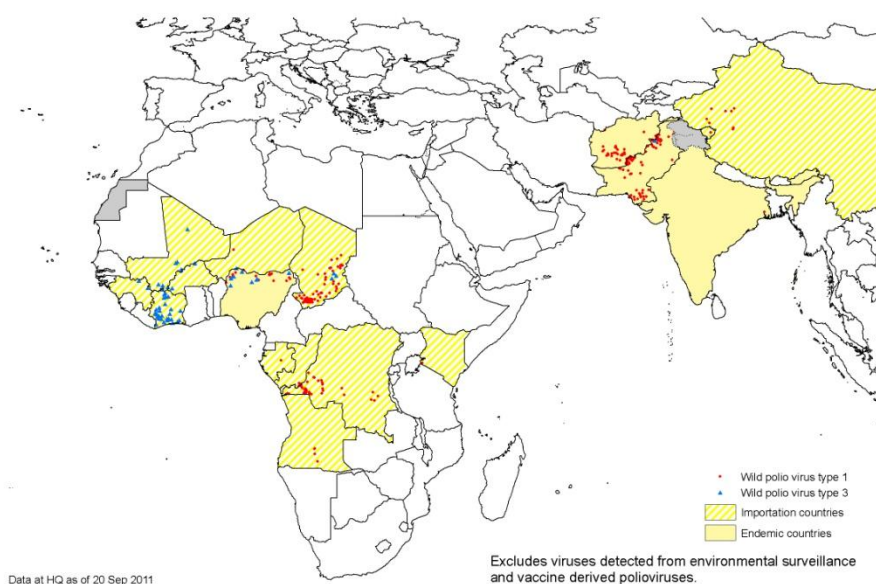


Figura 33. Casi di poliomielite causati da poliovirus selvaggio nel 2011 (3)

Nel 2011 si registra nel mondo una diminuzione del 52% del numero dei casi rispetto ai 1.352 del 2010. Infatti, si contano globalmente 650 casi, di cui 583 (90%) erano poliovirus selvaggio di tipo 1 (WPV1) e 67 (10%) erano poliovirus di tipo 3 (WPV3).

Dei 650 casi, si riportano 341 (53%) nei quattro Paesi endemici (Afghanistan, India, Nigeria, and Pakistan), 230 (35%) in Paesi precedentemente polio-free in cui le importazioni di poliovirus selvaggio hanno comportato un ristabilirsi della sua trasmissione per almeno dodici mesi (Angola, Ciad e Repubblica Democratica del Congo) e 79 (12%) in nove Paesi colpiti da un'epidemia (80). Rispetto al 2010 il numero dei casi di poliovirus selvaggio è aumentato in Afganistan del 69%, passando da 25 casi (17 WPV1, 8 WPV3) nel 2010 a 80 casi di WPV1 nel 2011, in Nigeria del 66%, con 62 (47 WPV1, 15 WPV3) casi registrati nel 2011 rispetto ai 21 (8 WPV1, 13 WPV3) e in Pakistan l'aumento è stato del 27%, con 198 (196 WPV1, 2 WPV3) casi nel 2011 rispetto ai 144 (120 WPV1, 24 WPV3) del 2010 (Tabella 17). Tra i Paesi endemici solo In India il numero di casi è diminuito drasticamente (98%), registrando un solo caso nel 2011 rispetto ai 42 (18 WPV1, 24 WPV3) del 2010 (93).

Nel 2011 si sono verificate globalmente undici epidemie, di cui due iniziate nel 2010: una di WPV3 in Mali e l'altra di WPV1 nella Repubblica del Congo. I nove nuovi focolai si sono verificati in Cina e in otto Paesi africani (WPV1 in Niger, Repubblica Centrale Africana, Gabon e Kenia; WPV3 in Costa d'Avorio, Mali, Niger e Guinea) (80).

Di particolare rilevanza risulta l'epidemia in Cina, che rappresenta la prima importazione di poliovirus selvaggio nella Regione OMS del Pacifico Occidentale dalla sua dichiarazione come polio-free nel 1997 e ha messo anche di nuovo in allarme la Regione OMS Europea per valutare le potenzialità di questa epidemia di diffondere in Paesi all'interno della Regione europea. Questo focolaio ha registrato 21 casi in adulti di età ≤53 anni (età media: 19 anni) nella Regione Autonoma occidentale di Xinjiang Uygur in seguito ad un'importazione di poliovirus selvaggio di tipo 1 dal Pakistan.

	WPV1	WPV3	All WPV
Polio-endemic countries	324	17	341
Afghanistan	80	—	80
India	1	—	1
Nigeria	47	15	62
Pakistan	196	2	198
Countries with reestablished transmission	227	3	230
Angola	5	—	5
Chad	129	3	132
Democratic Republic of the Congo	93	—	93
Countries affected by outbreaks	32	47	79
Côte d'Ivoire	—	36	36
Gabon	1	—	1
Mali	—	7	7
Niger	4	1	5
Republic of Congo	1	—	1
Kenya	1	—	1
China	21	—	21
Guinea	—	3	3
Central African Republic	4	—	4
Total	583	67	650

Tabella 17. Distribuzione dei casi di poliovirus selvaggio (1 e 3) nel 2011 nei diversi Paesi del mondo

Nel 2011 sono state condotte 302 SIAs in 53 Paesi utilizzando il vaccino orale. Le SIAs includevano 145 NIDs, 130 sNIDs, 17 “child health days” e 10 mop-up (94). Le SIAs sono state svolte: 57 (19%) nei Quattro Paesi endemic, 51 (17%) in tre Paesi in cui si era ristabilita la circolazione di poliovirus selvaggi, 61 (20%) in nove Paesi precedentemente polio-free e coinvolti in un’epidemia in seguito a importazione di poliovirus selvaggio e 133 (44%) come misura preventiva in 38 Paesi con nessun caso registrato nel 2011. Si stima che 2,35 miliardi di dosi di OPV sono state somministrate a 430 milioni di persone, principalmente a bambini di età inferiore ai 5 anni. Delle dosi somministrate il 41% erano tOPV, il 5% erano mOPV1, l’1% erano mOPV3 e il 53% erano bOPV (1 e 3). Le SIAs hanno anche coinvolto adulti di età ≤39 anni in alcune aree della Cina e nell’intera Repubblica democratica del Congo, visto il numero di casi adulti implicato nelle epidemie di tali Paesi.

Per quanto riguarda la sorveglianza delle PFA nel 2011, tutti i paesi colpiti dalla polio hanno raggiunto gli obiettivi di qualità richiesti per l’attività di sorveglianza delle PFA nel corso del 2011 a livello nazionale, ad eccezione della Costa d’Avorio. Tuttavia, i tre paesi in cui si è ristabilita la trasmissione e otto dei nove Paesi con focolai di poliovirus selvaggio nel 2011 hanno avuto una parte sostanziale (> 20%) delle loro popolazioni che vivono in aree territoriali con i sistemi di sorveglianza insoddisfacenti (95).

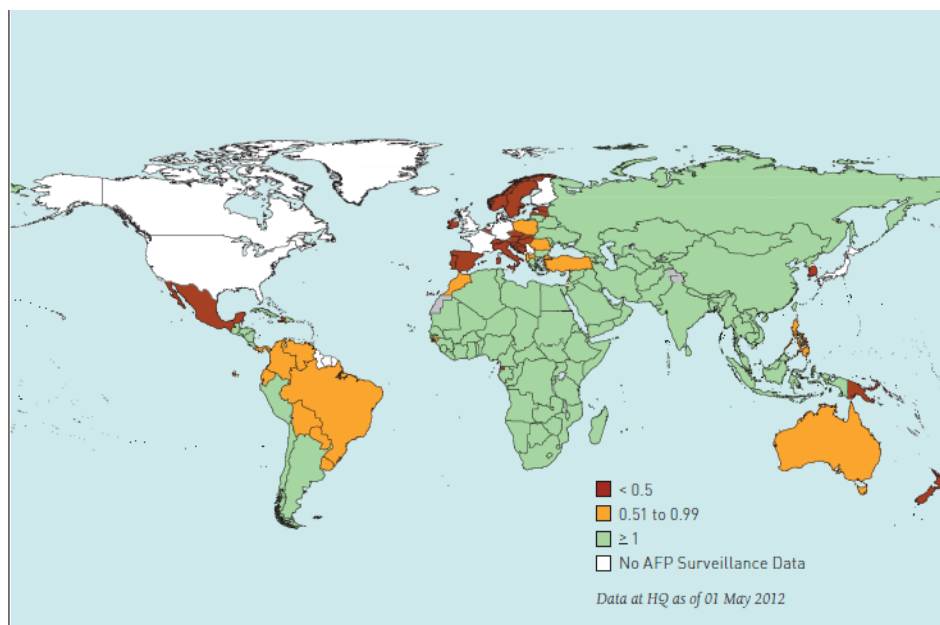


Figura 34. Sorveglianza delle PFA nel mondo, 2011 (Annual Report GPEI, 2011)

2.3.4.3 2012

Il 21 gennaio del 2012, dopo aver esaminato l'epidemiologia globale e la situazione finanziaria del GPEI, il Comitato esecutivo (Executive Board) dell'OMS ha approvato una storica risoluzione, dichiarando "il completamento dell'eradicazione della polio un'emergenza programmatica per la salute pubblica globale" (96).

Dal 28 febbraio 2012 l'India non è più considerata Paese endemico per la polio, dopo l'ultimo caso registrato il 13 gennaio 2011, anche se bisogna attendere tre anni dall'ultimo caso per poter ottenere la certificazione ufficiale.

Il successo dell'India dimostra la fattibilità tecnica di eradicazione globale della polio e mette in evidenza le possibili soluzioni per affrontare le sfide operative in altri Paesi (80).

Sulla base di piani di emergenza nazionali e nel riconoscimento delle sfide globali raggiunte, in particolare il successo dell'India a fermare la trasmissione della polio, il GPEI il 24 maggio di quest'anno ha sviluppato un piano d'azione globale di emergenza 2012-2013. Questo descrive una serie di nuove strategie e iniziative per meglio sostenere gli sforzi di eradicazione, tra cui (94):

- assistere l'Afghanistan, Nigeria e Pakistan, i tre Paesi ancora endemici, nell'aumentare significativamente la copertura vaccinale entro la fine del 2012 a livelli in grado di interrompere la trasmissione in breve tempo
- contribuire a sostenere lo slancio a interrompere la trasmissione nel 2012 in Angola, Ciad, Repubblica Democratica del Congo
- attuare un rigoroso processo di rendicontazione con il quale gli operatori sanitari e i dirigenti amministrativi possano monitorare e ritenersi responsabili nel seguire il programma a livello distrettuale e statale
- migliorare ulteriormente la responsabilità e il coordinamento dei partner coinvolti nell'eradicazione della polio

Il CDC ha attivato il suo centro operativo d'allarme (Emergency Operations Center) al fine di migliorare il sostegno per l'eradicazione, in collaborazione con l'OMS, Rotary International, l'UNICEF, la Bill and Melinda Gates Foundation, ministeri nazionali della salute, e altre organizzazioni partner.

I finanziamenti necessari per il Piano d'azione globale di emergenza 2012-2013 ammonta a 2,18 miliardi di dollari, a fronte del quale vi è una carenza di finanziamenti di 700 milioni di dollari (15 milioni di dollari per il 2012 e gli Stati Uniti 685 milioni dollari per il 2013) (3). La mancanza di fondi sufficienti nel primo semestre del 2012 ha costretto la cancellazione e il ridimensionamento delle SIAs in 24 Paesi. La piena attuazione dei piani nazionali di emergenza è urgente o l'obiettivo di un mondo libero dalla polio è a rischio (94).

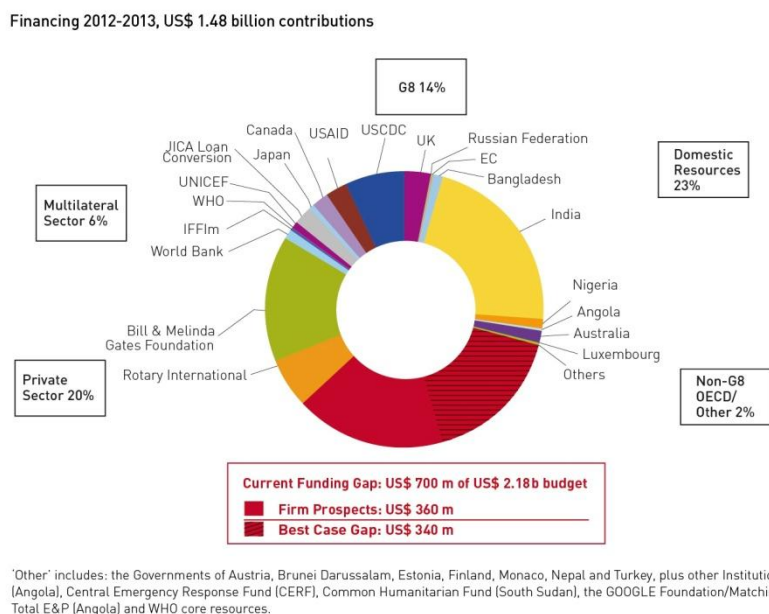


Figura 35. Costi 2012-2013

Ci sono cinque componenti principali che devono essere inclusi nel bilancio globale per l'eradicazione della polio:

1. La fornitura del vaccino antipolio orale, indispensabile per le attività di immunizzazione
2. Costi operativi delle attività supplementari di immunizzazione, necessari per la consegna dei vaccini ai centri di distribuzione e per la preparazione di mappe dettagliate delle abitazioni della zona da coprire e la formazione dei vaccinatori per fornire il vaccino a tutti i bambini
3. La sorveglianza, per l'individuazione, l'indagine e la comunicazione dei casi di PFA riscontrati, attraverso una rete informativa e la ricerca attiva nelle strutture sanitarie
4. Assistenza tecnica, mediante l'invio di consulenti per colmare le lacune del personale, per aiutare la realizzazione e la pianificazione delle campagne di immunizzazione, la gestione della logistica, delle previsioni e delle forniture, le risorse umane e la mobilitazione sociale
5. Mobilitazione sociale e delle comunicazioni, fondamentali soprattutto per raggiungere i bambini in zone ad alto rischio, per garantire un'elevata copertura immunitaria globale

Nel 2012 si registra un'importante iniziativa per quanto riguarda il raggiungimento di un'elevata copertura vaccinale: per la prima volta, dalla sua istituzione nel 2005, tutti i 53 Paesi della Regione OMS Europea hanno partecipato all'European Immunization Week (EIW) (88). Questo rappresenta

l'impegno unificato della Regione Europea alla sensibilizzazione sulla vaccinazione e alla diffusione del messaggio centrale di EIW: "Prevent. Protect. Immunize."

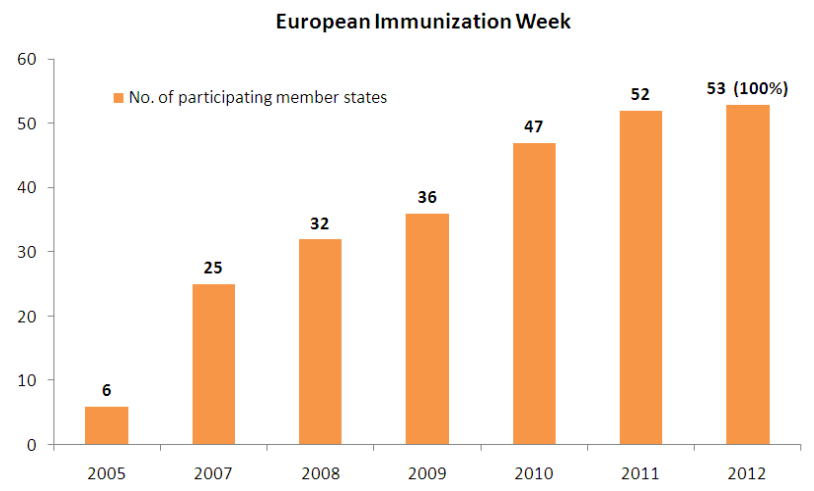


Figura 36. Numero dei Paesi della Regione OMS Europea partecipanti all'EIW negli anni 2005-2012 (88)

Al 14 novembre 2012 il numero dei casi di poliomielite e dei Paesi in cui si registrano i casi erano al loro livello più basso mai registrato. A livello globale, infatti, sono stati riportati 181 casi, con un calo del 64% rispetto allo stesso periodo del 2011 in 4 Paesi rispetto ai 16 del 2011. In tre di questi Paesi - Ciad, Pakistan e Afghanistan - il numero dei casi è diminuito rispettivamente del 95%, 65% e 42%, rispetto al 2011 (97). In Nigeria, invece, il numero di casi è aumentato del 140% rispetto allo stesso periodo del 2011, nonostante l'evidenza recente di migliorare le prestazioni nel programma di eradicazione. Solo 21 casi sono stati sostenuti dal tipo 3, di cui 18 in Nigeria e 3 in Pakistan.

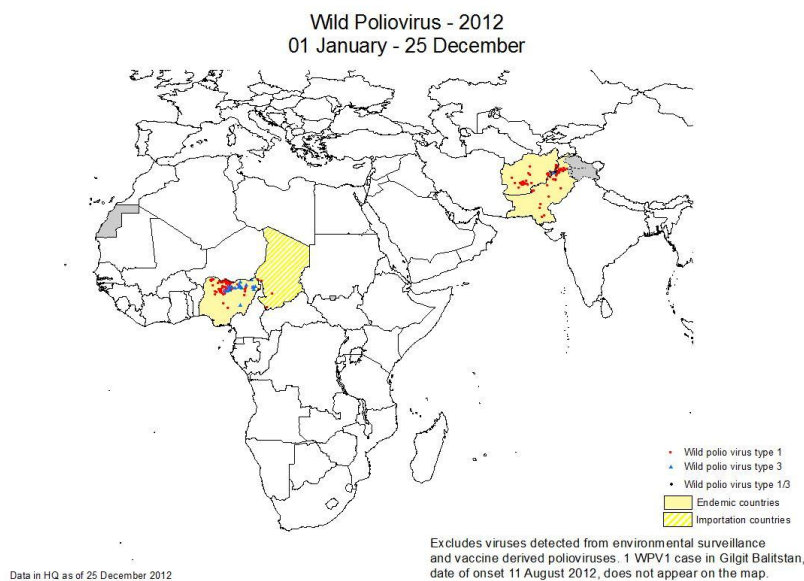


Figure 37. Casi di poliomielite nel 2012 (aggiornamento al 25 dicembre 2012) (3)

Inoltre al 26 dicembre sono trascorsi più di 12 mesi da quando la Repubblica democratica del Congo, ha riferito il suo ultimo caso di poliovirus selvaggio (il caso più recente risale al 20 dicembre 2011). Tuttavia, anche se non ha avuto casi WPV nel 2012, è stato colpito dalla circolazione di poliovirus derivati dal vaccino tipo 2 (cVDPV2), con 17 casi segnalati (caso più recente: 4 aprile 2012). Sono in corso gli ultimi sforzi per garantire la completa interruzione di questo focolaio. Al 26 dicembre casi registrati globalmente sono 215, di cui 210 nei tre Paesi endemici, e con un solo Paese non endemico coinvolto, il Ciad, in cui si sono verificati solo 5 casi (Tabella 18).

Countries	Year-to-date 2012				Year-to-date 2011				Total in 2011	Date of most recent case
	WPV1	WPV3	W1W3	Total	WPV1	WPV3	W1W3	Total		
Pakistan	54	2	1	57	179	2		181	198	20-Nov-12
Afghanistan	35			35	71			71	80	25-Nov-12
Nigeria	99	19		118	39	11		50	62	20-Nov-12
India					1			1	1	13-Jan-11
Chad	5			5	127	3		130	132	14-Jun-12
DR Congo					89			89	93	20-Dec-11
Angola					5			5	5	07-Jul-11
Niger					2	2		4	5	22-Dec-11
CAR					3			3	4	08-Dec-11
China					21			21	21	09-Oct-11
Guinea						3		3	3	03-Aug-11
Kenya					1			1	1	30-Jul-11
Côte d'Ivoire						36		36	36	24-Jul-11
Mali						7		7	7	23-Jun-11
Congo					1			1	1	22-Jan-11
Gabon					1			1	1	15-Jan-11
Total	193	21	1	215	540	64	0	604	650	
Total in endemic countries	188	21	1	210	290	13	0	303	341	
Total outbreak	5	0	0	5	250	51	0	301	309	

Data in WHO as of 27 December 2011 for 2011 data and 25 December 2012 for 2012 data.

Tabella 18. Casi di poliovirus selvaggio nel 2011 e nel 2012

Come richiesto da parte della 65° Assemblea Mondiale della Sanità nella risoluzione WHA65.5, il GPEI sta attualmente sviluppando un piano strategico per la completa eradicazione della polio: Endgame Strategic Plan 2013-2018, di cui per ora vi è disponibile una bozza, aggiornata al 7 dicembre (98). Il piano è stato sviluppato tra giugno e ottobre 2012 durante un'ampia consultazione tra i vari Paesi, i partner, i soggetti interessati, i finanziatori, i produttori di vaccini, le agenzie di regolamentazione e gli organismi consultivi nazionali e internazionali. Ha come scopo quello di completare l'eradicazione e il contenimento di tutti i selvaggi e dei poliovirus Sabin-like correlati al vaccino, in modo tale che nessun bambino possa mai più soffrire di poliomielite paralitica.

Il 6 novembre 2012, il Gruppo consultivo strategico di esperti di immunizzazione (Strategic Advisory Group of Experts on immunization - SAGE) ha approvato i quattro obiettivi principali del piano strategico e le tappe associate, vale a dire (Figura 38):

1. l'interruzione della trasmissione dei poliovirus selvaggi residuo entro la fine del 2014
2. il ritiro della componente del tipo 2 dal vaccino orale trivalente dai programmi di immunizzazione di routine a livello globale il più presto possibile
3. l'avvio della pianificazione di riferimento per il GPEI nel 2013-2014
4. il contenimento delle riserve di poliovirus selvaggio e la certificazione dell'eradicazione dei poliovirus selvaggi entro la fine del 2018

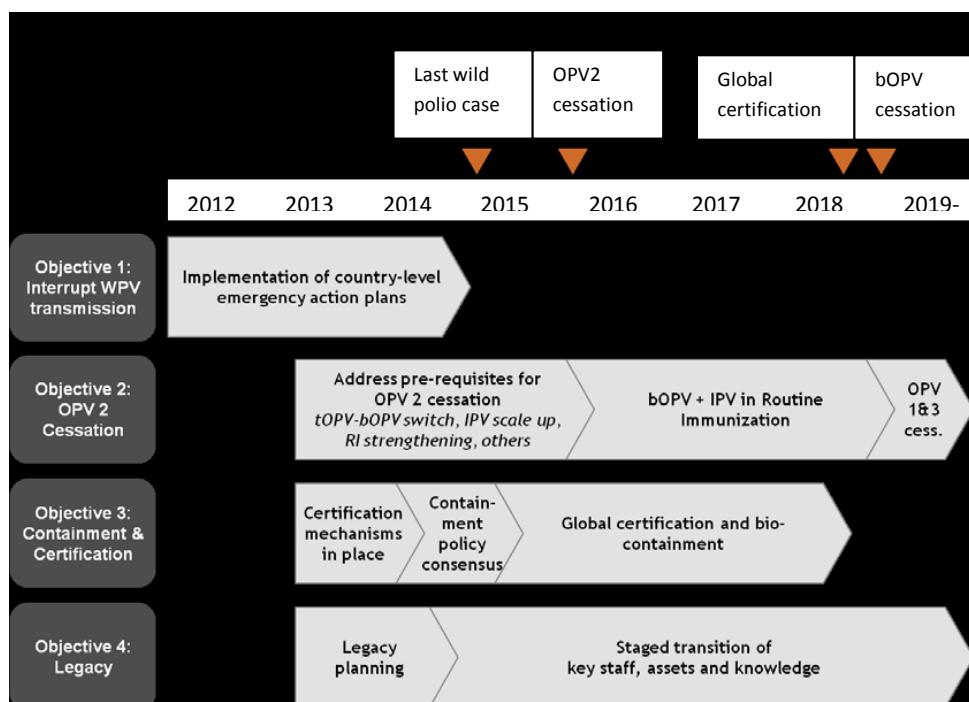


Figura 38. Obiettivi e attività dell'Endgame Strategic Plan del 2013-2018 (98)

Ulteriori consultazioni con i finanziatori, i Paesi e le altre parti interessate sono in corso nel mese di dicembre, e ai primi di gennaio 2013 sarà disponibile una revisione del Piano, che incorpora i commenti finali, inclusi quelli dei membri SAGE. Il Piano sarà riesaminato in occasione del prossimo Consiglio Esecutivo il 21-29 Gennaio 2013.

2.3.5 Situazione italiana

In Italia la legge n. 695 del 30 luglio 1959 rese universale l'offerta della vaccinazione antipoliomielitica con il vaccino IPV. Successivamente nel 1964 si passò all'uso del vaccino OPV.

Nel periodo 1958-1964 vennero condotte campagne di vaccinazione su base volontaria che non determinarono cambiamenti significativi nella frequenza dei casi di poliomielite paralitica; dal 1966 la vaccinazione con OPV venne resa obbligatoria per tutti i nuovi nati (legge n.51 del 4/02/1966).

Grazie alle campagne di vaccinazione di massa del 1964 e all'impiego sistematico di OPV, il numero di casi di poliomielite in Italia si è progressivamente ridotto fino ad annullarsi: l'incidenza della malattia è scesa da una media di 3.900 casi all'anno nel decennio 1950-1959 a 254 casi nel 1965 fino a pochi casi sporadici negli anni '70 e alla totale assenza dal 1989.

Gli ultimi casi autoctoni di poliomielite risalgono al 1982, quando si verificò un piccolo focolaio epidemico con 3 casi in bambini non vaccinati residenti nella provincia di Napoli; nel 1983 e nel 1988 sono stati registrati casi di poliomielite importata in bambini non vaccinati proveniente rispettivamente dall'Iran e dall'India (40).

Anno	Casi N.	Anno	Casi N.	Anno	Casi N.	Anno	Casi N.
1950	2.034	1960	3.518	1970	44	1980	1
1951	2.867	1961	3.467	1971	24	1981	1
1952	2.768	1962	3.243	1972	12	1982	3
1953	4.998	1963	2.855	1973	15	1983	1
1954	3.228	1964	901	1974	9	1984	0
1955	2.705	1965	263	1975	4	1985	0
1956	3.470	1966	133	1976	9	1986	0
1957	4.453	1967	104	1977	9	1987	0
1958	8.394	1968	78	1978	8	1988	1
1959	4.241	1969	56	1979	3	1989	0
						1990	0

Tabella 19. Casi di poliomielite con paralisi notificati in Italia, in rapporto alla vaccinazione con virus inattivato (1958-64) e a quella con virus viventi e attenuati (dal 1964 su base volontaria, dal 1967 obbligatoria – dati ISTAT). Su sfondo grigio i casi provenienti dall'estero

L'Italia è stata dichiarata polio-free il 21 giugno 2002 insieme al resto della Regione OMS Europea, in seguito all'ultimo caso registrato in Turchia nel 1999 (Tabella 19). Nel 2012 sono stati celebrati i 20 anni da tale dichiarazione.

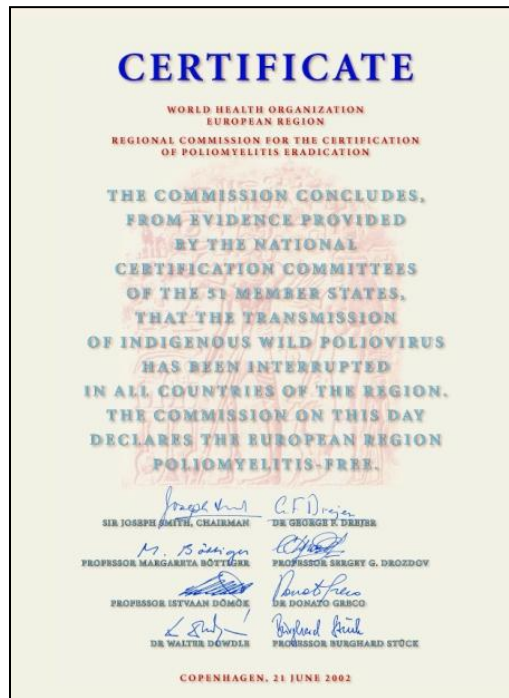


Figura 38. Certificato di eliminazione della poliomielite nella Regione OMS Europea

L'Italia, così come gli altri paesi europei, potrebbe in teoria rivedere nuovi casi, anche in considerazione dell'elevata presenza di immigrati provenienti dall'Africa e dal sub-continente indiano. Basti ricordare la recente epidemia che ha avuto luogo in Tagikistan e che ha messo in discussione la certificazione polio-free della Regione Europea. E' estremamente importante pertanto che la vaccinazione contro la polio non subisca flessioni e sia mantenuta sempre alta la guarda. Le principali misure atte a scongiurare la possibilità di un ritorno della polio nei Paesi occidentali come l'Italia sono:

1. mantenere elevata la copertura vaccinale nei paesi liberi da polio con il vaccino ucciso IPV
2. fare una dose di richiamo anti-polio con vaccino IPV inattivato ai viaggiatori che si rechino nei paesi endemici ed in quelli in cui si è riverificata la trasmissione di poliovirus
3. pretendere un certificato di vaccinazione antipolio o, meglio ancora vaccinare nuovamente con vaccino orale OPV, ogni immigrato che provenga dalle zone endemiche.

3. MATERIALI E METODI

3.1 LA SORVEGLIANZA DELLE PARALISI FLACCIDE ACUTE (PFA)

La sorveglianza delle PFA, finalizzata ad individuare tutti i casi di paralisi flaccida acuta per identificare quelli causati dai poliovirus, si basa principalmente sulle seguenti azioni:

- ✓ Individuazione e notifica di ogni caso di PFA, dovuto a qualsiasi eziologia (Sindrome di Guillain-Barré, polineurite, mielite trasversa, trauma, compressione spinale, infezioni da altri virus o batteri, intossicazioni, etc.) in soggetti di età inferiore a 15 anni, e di ogni caso di sospetta polio in persone di tutte le età
- ✓ Raccolta, entro 14 giorni dall'inizio della paralisi e a 24-48 ore di distanza l'uno dall'altro, di due campioni di feci, anche nei casi in cui si esclude l'eziologia infettiva (trauma, compressione spinale, polineurite, patologie demielinizzanti, malattie sistemiche e metaboliche, etc.)
- ✓ Esecuzione delle indagini virologiche per la ricerca dei poliovirus
- ✓ Classificazione finale dei casi segnalati entro 60-90 giorni dall'inizio della sintomatologia paralitica

Nei Paesi come il nostro in cui non si osservano casi di polio da almeno un anno ogni caso di paralisi flaccida dovrebbe essere considerato “un'emergenza di sanità pubblica” che dovrebbe essere investigato immediatamente ed esaminato da esperti; in particolare è necessaria la raccolta e l'analisi dei due campioni di feci.

3.1.1 Rete della Sorveglianza delle PFA in Lombardia

In Lombardia dal 1997 viene svolta la sorveglianza attiva delle PFA, in collaborazione con l'Istituto Superiore di Sanità (ISS) e il Dipartimento di Prevenzione del Ministero della Salute.

Il Centro di Riferimento Regionale (CRR) della Lombardia ha sede a Milano presso il laboratorio di Virologia del Dipartimento di Scienze Biomediche per la Salute, già Dipartimento di Sanità Pubblica-Microbiologia-Virologia, presso il quale ho svolto la mia attività.

Il Referente Regionale presso il CRR dal 1997 al 2011 era la Professoressa Maria Barbi, sostituita poi, in seguito al suo pensionamento, dal Dottor Sandro Binda.

Il CRR in quanto dotato di laboratorio accreditato, oltre a coordinare il funzionamento della rete di sorveglianza, svolge le indagini virologiche sui campioni biologici.

Per condurre la sorveglianza delle PFA, il CRR ha costituito una rete di medici ospedalieri che sorvegliano la situazione regionale. A tale scopo sono stati contattati gli Ospedali con reparti di Neurologia, Neuropsichiatria infantile e Pediatria che rappresentano i reparti in cui, con maggior probabilità, vengono ricoverati i bambini con una paralisi flaccida acuta.

Dal 1997 ad oggi è cambiato il numero di strutture ospedaliere aderenti che partecipano separatamente alla rete, con un totale di 51 presidi ospedalieri, appartenenti a 35 Aziende Ospedaliere, coinvolti nel 2012

distribuiti tra tutte le dodici province lombarde (Figura 1), con un incremento di adesioni rispetto agli anni precedenti: nel 2010 i presidi ospedalieri erano 45 (appartenenti a 29 Aziende Ospedaliere) e nel 2011 46 (appartenenti a 30 Aziende Ospedaliere).

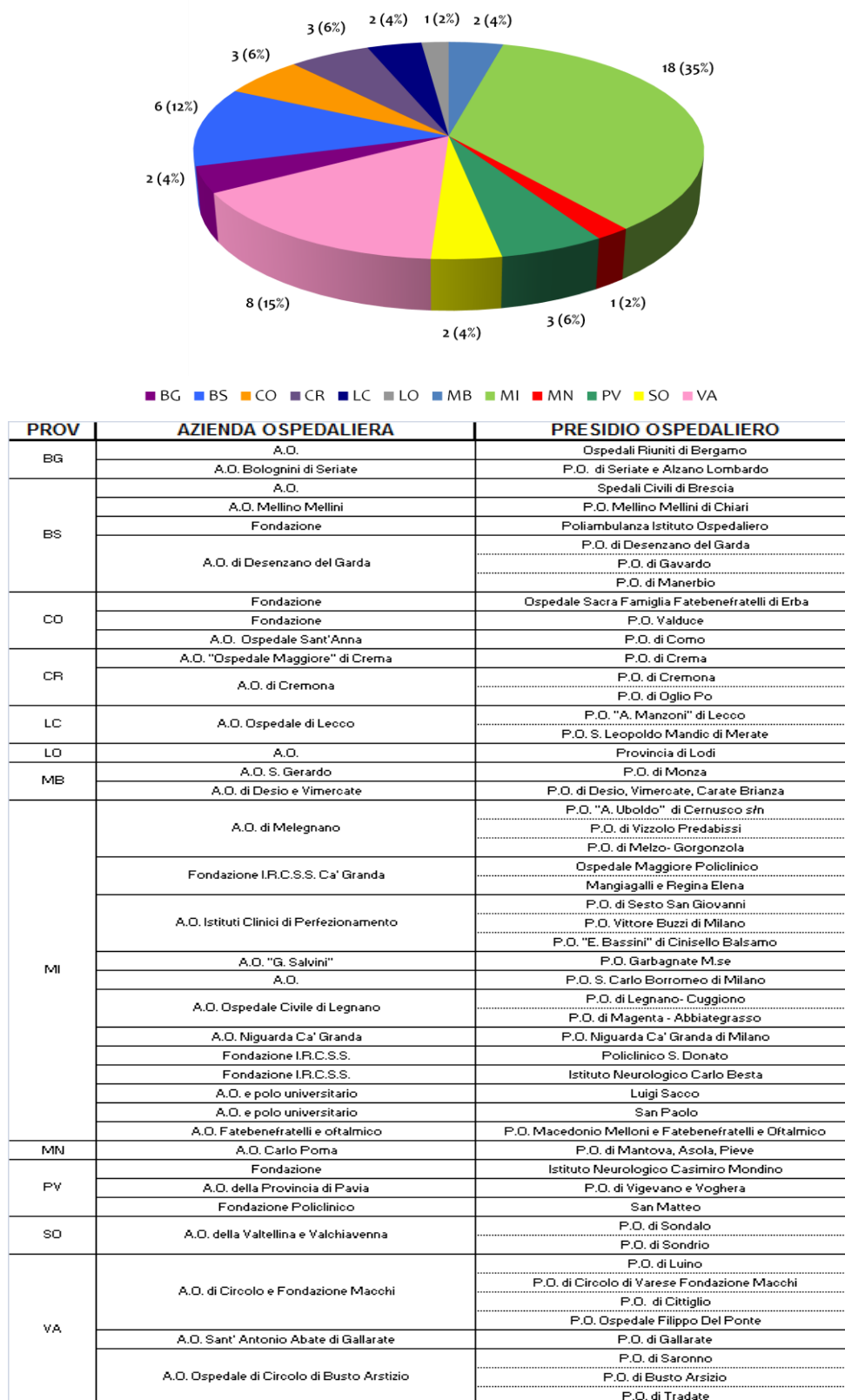


Figura 1. Strutture aderenti alla rete di sorveglianza nel 2012

La rete di sorveglianza delle PFA prevede l'adesione, mediante la compilazione di un modulo ("scheda di adesione", vedere appendice) da parte degli Ospedali, con l'indicazione di un referente ospedaliero, la cui attività consiste nel segnalare quindicinalmente, tramite la compilazione e l'invio di un modulo ("riepilogo quindicinale o report zero", vedere appendice), l'eventuale presenza o anche l'assenza di casi di PFA dovuti a qualsiasi causa.

Il CRR si occupa quindi di raccogliere le adesioni e di ricevere le segnalazioni di assenza/presenza di casi di PFA ogni quindici giorni.

3.1.2 Segnalazione di un caso di PFA

La segnalazione di un caso di paralisi flaccida acuta prevede un certo iter da seguire dall'individuazione del caso alla sua classificazione finale (Figura 2).

Il medico dell'Ospedale in cui viene ricoverato un paziente con una paralisi flaccida acuta, una volta individuato il caso, deve procedere alla compilazione del "modulo di segnalazione iniziale" (vedere appendice) e provvedere all'invio di un campione di siero e di due campioni di feci entro 14 giorni dall'esordio della paralisi (accompagnati dal "modulo dei prelievi", vedere appendice). Dopo quindici giorni deve inviare il secondo campione di siero; infine a 60-90 giorni deve essere compilato il "modulo di follow-up" (vedere appendice).

Il CRR si occupa di eseguire le indagini virologiche sui campioni biologici e di inviare i risultati delle analisi all'ospedale e all'ISS.

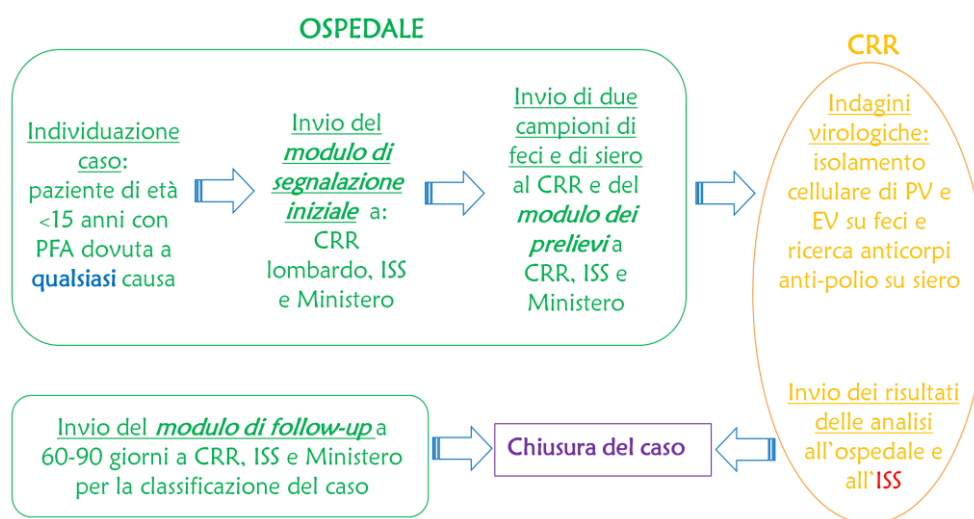


Figura 2. Iter di segnalazione di un caso

3.1.2.1 Definizione di caso

Soggetto di età compresa tra 0 e 14 anni con paralisi flaccida ad esordio acuto, dovuto a qualsiasi causa, anche se è già stata esclusa un'eziologia virale.

La paralisi flaccida acuta si definisce come una sindrome ad inizio rapido ed improvviso caratterizzata da paresi o paralisi degli arti. Nei casi più gravi vengono coinvolti anche i muscoli respiratori o della deglutizione. Il termine flaccido indica l'assenza di spasticità dei muscoli colpiti nonché l'assenza di altri segni come ipereflessia, cloni, riflesso plantare di estensione. Alcune delle possibili paralisi flaccida acuta,

oltre la poliomielite, sono: paralisi simipoliomielitica causata da altri altri enterovirus, sindrome di Guillan-Barré, mielite trasversa e traumatica e paralisi da tumore (se non diagnosticata immediatamente).

3.1.2.2 **Modulistica**

La segnalazione di un caso prevede la compilazione di tre moduli, che devono essere inviati contemporaneamente al centro di riferimento regionale, all'Istituto Superiore di Sanità e al Ministero della salute. Questi sono i seguenti:

- 1- “Modulo di segnalazione iniziale”, da compilare all'individuazione del caso, in cui vengono indicati i dati anagrafici del paziente, il tipo di paralisi da cui è affetto e lo stato vaccinale
- 2- “Modulo di conferma dei prelievi”, che accompagna i campioni biologici, in cui vengono indicate le date di prelievo
- 3- “Modulo di follow-up a 60 giorni” , da compilare a 60 o al massimo 90 giorni dall'esordio della paralisi per monitorarne l'andamento

3.1.2.3 **Campioni biologici**

Per ciascun caso di PFA segnalato è prevista l'analisi dei seguenti campioni biologici, che devono essere inviati tempestivamente al laboratorio per l'esecuzione delle analisi per poter escludere la causa poliomielitica:

- **due campioni di feci**, che rappresentano il materiale più idoneo perché i poliovirus si moltiplicano nel tratto intestinale per diverse settimane dopo l'infezione raccolti. Vanno raccolti entro 14 giorni dall'esordio della paralisi (meglio a 7 giorni) e a 24-48 ore di distanza l'uno dall'altro, poiché l'eliminazione del virus può essere intermittente
- **due campioni di siero**, uno raccolto nella fase acuta della malattia e l'altro a distanza di 15-20 giorni, in fase convalescente, per la titolazione degli anticorpi neutralizzanti antipolio, in quanto l'aumento di 4 volte del titolo anticorpale del secondo campione di siero rispetto al primo, rappresenta un'infezione da poliovirus
- se disponibili il campione di **liquor** e il **tampone faringeo**, che risultano meno utili rispetto alle feci poiché nell'orofaringe il virus è presente solamente per 7-10 giorni dopo l'esordio della malattia e ad un titolo minore rispetto alle feci; per quanto riguarda il campione di liquor, nonostante il neurotropismo dei poliovirus, solo raramente si riesce a riscontrare la presenza dei poliovirus.

3.1.3 **Preparazione dei campioni biologici**

I campioni devono essere raccolti il prima possibile dall'esordio della malattia e trasportati al laboratorio in condizioni ottimali.

I campioni di **feci** devono essere raccolti in un contenitore sterile. Giunti in laboratorio vengono trattati con cloroformio (0,5 ml/gr di campione) per rimuovere l'eventuale presenza di batteri, funghi e lipidi potenzialmente tossici e per dissociare gli aggregati virali.

Il **siero**, ottenuto da campioni di sangue periferico, arriva già tale in laboratorio.

Il **tampone faringeo** viene eseguito mediante gli appositi tamponi con estremità in cotone e posto, subito dopo il prelievo, il tampone viene posto in provette contenenti 1,5 ml di Viral Transport Medium (VTM), un terreno sterile specifico per la conservazione dei virus, costituito da soluzione di Hank

contenente sieroalbumina bovina e antibiotici. Una volta giunta in laboratorio, la provetta viene agitata, mediante l'utilizzo di un vortex, per permettere il rilascio del materiale raccolto dal tampone.

Il **liquor**, raccolto in provette sterili, viene utilizzato tal quale.

3.1.4 Metodi virologici

Secondo il manuale di riferimento redatto nel 1997 dall'OMS "Manual for the virological investigation of polio" (99) di cui sono dotati tutti i laboratori che partecipano alla sorveglianza delle PFA, il metodo di riferimento è l'isolamento in coltura cellulare dei campioni di feci. Tutte le procedure che riguardano tale metodica vengono effettuate rispettando tali linee guida dell'OMS. Nel nostro laboratorio vengono inoltre utilizzate le metodiche di biologia molecolare, più sensibili e veloci rispetto all'isolamento cellulare.

3.1.4.1 Allestimento delle colture cellulari

I poliovirus e gli altri enterovirus crescono su un'ampia varietà di linee cellulari, ma l'OMS raccomanda l'utilizzo di almeno due tra le seguenti linee cellulari:

- **RD** (Human Embryonic Rhabdomyosarcoma): linea cellulare derivata dal tessuto tumorale umano del rhabdomyosarcoma, suscettibile alla maggior parte degli enterovirus umani;
- **Hep-2** (Human Larinx Epidermoid Carcinoma): cellule derivate da carcinoma umano dell'epidermide
- **L2ob**: linea cellulare ricombinante che deriva dalle "cellule L" murine modificate per esprimere costitutivamente il recettore per i poliovirus (HPVR). Questa caratteristica la rende suscettibile all'infezione da poliovirus e altamente selettiva poiché non permissiva per altri virus enterici umani.

Tutte e tre le linee cellulari sono altamente suscettibili ai poliovirus. Come regola generale i poliovirus e i coxsackie virus B crescono facilmente nelle cellule Hep-2, mentre nelle cellule RD si osserva la crescita dei poliovirus, degli echovirus, di alcuni coxsackie A e di alcuni altri enterovirus; le cellule L2ob sono selettive solamente per i poliovirus. La selezione di queste linee cellulari per la diagnosi di poliomielite in laboratorio permette la standardizzazione delle metodiche e la possibilità di confronto dei risultati tra vari laboratori di virologia. Nel nostro laboratorio vengono utilizzate le RD e le L2ob. L'uso combinato di queste linee cellulari fornisce un'elevata specificità nel rilevamento dei poliovirus grazie alle L2ob e, grazie alle RD, un elevato livello di sensibilità nell'individuare i poliovirus e molti altri enterovirus come garanzia del funzionamento della metodica. L'OMS ha infatti stimato che affinché la sorveglianza sia di buona qualità ci si aspetta di evidenziare la presenza di enterovirus almeno nel 10% dei campioni esaminati.

Entrambe queste linee crescono su un supporto solido, quindi per la loro propagazione sono state utilizzate fiasche da 75 cm² (Iwaki) e terreno E-MEM (Eagle Minimum Essential Medium, con L-glutamina, BioWhittaker-Cambrex) addizionato del 10% di siero fetale FBS (Fetal Bovine Serum, BioWhittaker-Cambrex).

Tutte le colture sono state conservate a 37°C in un incubatore ad atmosfera controllata al 5% di CO₂ e umidità al 90%.

Le prove di isolamento sono state invece effettuate in fiasche da 25 cm² e tubi da coltura.

La preparazione delle cellule per il successivo inoculo dei campioni biologici è avvenuta come segue: la fiasca da 75 cm² contenente le cellule di interesse, conservata a 37°C in incubatore al 5% di CO₂, veniva osservata al microscopio ottico per accertare che le cellule fossero confluenti ed in buono stato; in caso affermativo, il surnatante veniva eliminato e si effettuavano due lavaggi con 1 ml di una soluzione di tripsina (0,05%) - EDTA (0,02%) (BioWhittaker-Cambrex) per eliminare i residui di terreno.

Dopo aver aggiunto 1,5 ml di questa stessa soluzione, la fiasca veniva mantenuta a 37°C per alcuni minuti per favorire l'azione della tripsina, permettendo il taglio enzimatico dei legami proteici che legano le cellule le une alle altre e al supporto. L'azione dell'enzima veniva bloccata aggiungendo un quantitativo arbitrario di terreno E-MEM.

Le cellule disperse in E-MEM, sono state suddivise per ottenere la concentrazione adeguata alla ricostituzione di nuove colture di ogni linea cellulare e all'allestimento delle fiasche e dei tubi dove si è eseguito l'isolamento virale.

La scelta del tipo di rapporto di split utilizzato era dettata dal bisogno di avere a disposizione cellule che sopravvivessero per la settimana successiva, in modo da consentirne le letture e quindi risultava rapportata alla velocità di crescita delle cellule stesse.

Le cellule derivanti dalla tripsinizzazione venivano risospese in un quantitativo opportuno di E-MEM addizionato del 10% di siero fetale bovino e aliquotate nei vari tubi o fiasche da 25 cm² (rispettivamente Corning e Iwaki) in cui successivamente si sarebbero inoculati i campioni. Le fiasche venivano preparate uno o due giorni prima del loro utilizzo per permettere la formazione di un monostrato confluyente, ma ancora giovane e quindi perfettamente sensibile, accertato attraverso osservazione al microscopio ottico.

In una fiasca da 75 cm² con monostrato confluyente di RD ci sono in media 15.000.000 cellule. Di queste 1/6 sono state utilizzate per allestire una nuova fiasca per la propagazione della linea; per ottenere una fiasca da 25 cm² sono state usate circa 800.000 cellule, mentre in ciascun tubo sono state poste circa 150.000 cellule.

Le fiasche di L20b quando raggiungono la confluenza contengono circa 10.000.000 cellule e il ciclo mitotico di queste cellule è più lento rispetto a quello delle RD, quindi per allestire una nuova fiasca da 75 cm² è stato usato 1/3 delle cellule di partenza, mentre sono state usate circa 1.100.000 cellule per ciascuna fiasca da 25 cm² e circa 200.000 cellule per ciascun tubo.

Tutte le fasi di allestimento delle colture cellulari sono avvenute sotto cappa a flusso laminare di classe II, impiegata solo a questo scopo, per evitare contaminazioni.

3.1.4.2 *Isolamento in coltura cellulare*

Il metodo di riferimento per la ricerca dei poliovirus e degli enterovirus non-polio è l'isolamento in coltura cellulare.

I campioni di feci e, dove disponibili, il liquor e il tampone faringeo, opportunamente preparati, vengono inoculati in fiasche da 25 cm² contenenti cellule L20b oppure cellule RD, allestite come precedentemente descritto (paragrafo 3.1.4.1).

Dopo aver verificato l'opportuna crescita ed aver contrassegnato le fiasche, è stato sostituito il terreno di crescita delle cellule contenute in ciascuna di esse con 5 ml di un nuovo terreno di mantenimento costituito da E-MEM addizionato del 2% di siero fetale scomplementato, dello 0.5% di penicillina-streptomina e di 0.1% di fungizone. Ogni campione è stato seminato in fiasche di L20B e di RD e sono stati allestiti adeguati controlli negativi necessari per l'attendibilità dei risultati.

Dopo aver inoculato 0,5 ml di campione ciascuna fiasca è stata mantenuta a 37°C in un incubatore al 5% di CO₂ ed osservata al microscopio ottico quotidianamente fino all'eventuale comparsa di un effetto citopatico (CPE: CytoPathic Effect) o per almeno 14 giorni in caso di negatività.

A causa della velocità di crescita e di invecchiamento delle cellule utilizzate, durante il periodo di osservazione delle colture è consigliabile effettuare passaggi in cieco con cadenza settimanale, trasferendo 0,2 ml del surnatante di ciascuna fiasca in 3 tubi da coltura contenenti cellule dello stesso tipo. Anche in questo caso la lettura viene effettuata quotidianamente per 14 giorni. Questo ulteriore passaggio in tubi serve per prolungare il tempo di osservazione ed aumentare la sensibilità dell'isolamento nei campioni a basso titolo virale.

E' risaputo che l'isolamento su L2ob è meno sensibile che su RD in quanto le cellule usate non sono umane ma murine. Per ovviare a questo problema si è deciso di effettuare un terzo passaggio dei soli campioni positivi su RD in L2ob, aumentando così la probabilità di isolamento.

3.1.4.3 Osservazione delle colture

La lettura quotidiana delle fiasche e dei tubi al microscopio ottico ha permesso di rilevare l'eventuale presenza di un CPE.

L'effetto citopatico da enterovirus si manifesta generalmente con la perdita dell'organizzazione tipica del monostrato: le cellule diventano rifrangenti e tondeggianti, per poi talvolta staccarsi tra loro ed in seguito dal supporto. Il fenomeno culmina nella lisi cellulare (Figura 3).

L'estensione del CPE viene valutata secondo una scala di 4 gradi:

- ✓ Grado 1: è interessato il 25% del monostrato;
- ✓ Grado 2: è interessato il 50% del monostrato;
- ✓ Grado 3: è interessato il 75% del monostrato;
- ✓ Grado 4: è interessato il 100% del monostrato

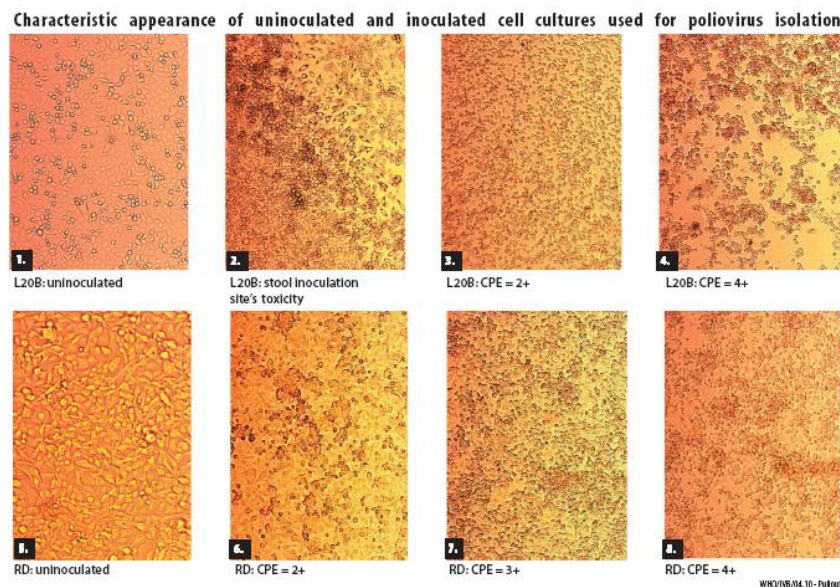


Figura 3. Monostrati di cellule L2ob e RD e comparsa di CPE

3.1.4.4 Test di neutralizzazione in micropiastra

Come previsto dalle linee guida dell'OMS, in caso di comparsa di CPE su cellule L20b è opportuno approfondire le indagini eseguendo sull'isolato un test di neutralizzazione per la caratterizzazione del poliovirus. I campioni positivi devono essere inviati all'Istituto Superiore di Sanità (ISS) per la conferma del risultato e per l'eventuale caratterizzazione molecolare dei virus.

Questo test si basa sulla combinazione di sieri monospecifici contenenti anticorpi anti poliovirus ad alto titolo. Prevede l'allestimento di una piastra a 96 pozzetti (Iwaki). In ogni pozzetto, ad eccezione di quelli dedicati al controllo negativo e al controllo positivo, si dispensano 50 µl di E-MEM, 25 µl di antisiero contenente anticorpi neutralizzanti specifici e 25 µl dell'isolato da caratterizzare, precedentemente titolato in modo da contenere 100 TCID₅₀ (dosi citotossiche 50). In ogni piastra sono stati allestiti un controllo negativo, o controllo cellule, contenente esclusivamente 100 µl di E-MEM ed un controllo positivo, o controllo virus, contenente 75 µl di E-MEM e 25 µl di sospensione virale.

Dopo un'ora di incubazione a 37°C si sono aggiunte a ciascun pozzetto circa 15.000 cellule sospese in 50 µl di terreno di crescita. La piastra così allestita è stata mantenuta a 37°C in un incubatore al 5% di CO₂ e letta quotidianamente fino a comparsa dell'effetto citopatico nei pozzetti dedicati al controllo positivo. Il sierotipo del poliovirus viene identificato in base alla comparsa o meno del CPE dopo reazione con gli antisieri specifici. Ci si aspetta infatti che l'infezione del monostrato da parte del poliovirus sia inibita dalla presenza di anticorpi specifici contro tali virus impedendo quindi la comparsa di CPE. Generalmente si preferisce non usare i singoli sieri, ma allestire pool composti da coppie di essi (anti PV1 + anti PV2, anti PV1 + anti PV3 e anti PV2 + anti PV3) per garantire l'identificazione anche di miscele di virus (Figura 4).

Viene anche eseguito il test di neutralizzazione per la tipizzazione degli enterovirus non-polio sui campioni positivi su cellule RD impiegando pool di antisieri in grado di riconoscere i sierotipi di enterovirus di maggior interesse (coxsackie ed echovirus) (Figura 5). Per lo svolgimento di tale test l'OMS indica l'utilizzo di un kit specifico (fornito dal National Institute of Public Health and Environment, RIVM, Bilthoven-Olanda) il quale contiene complessivamente 10 pool di sieri in grado di identificare i 3 sierotipi di poliovirus, i 6 coxsackie B, 20 Echovirus e Coxsackie A9.

La combinazione di pool che neutralizzano la replicazione virale e la comparsa del CPE permettono di identificare il virus isolato (Tabella 1).

Questa metodica prevede l'allestimento di una piastra a 96 pozzetti (Iwaki): in ogni pozzetto sono stati inoculati 25 µl di terreno E-MEM, 25 µl di antisiero contenente anticorpi neutralizzanti specifici e 25 µl di campione (surnatante della fiasca che aveva mostrato CPE) diluito serialmente in base 10. Inoltre sono stati aggiunti 25 µl di cellule RD con split 1:12 (circa 20.000 cellule per ogni pozzetto) dopo un'ora di incubazione a 37°C. Ciascun campione è stato inoculato su due righe. In ogni piastra sono stati allestiti un controllo negativo o controllo cellule (contenente 50 µl di PSCOF al 10% e 50 µl di cellule RD) in cui non sono stati inoculati né il campione né l'antisiero ed un controllo positivo o controllo virus (contenente 50 µl di PSCOF al 10%, 25 µl di campione e 25 µl di cellule RD) in cui non è stato inoculato l'antisiero.

Quindi il monostrato cellulare dei pozzetti del controllo cellule e di quelli in cui l'antisiero aveva neutralizzato il virus presente aveva un aspetto normale, mentre il monostrato dei pozzetti del controllo virus e di quelli in cui l'antisiero non aveva neutralizzato il virus presentava un effetto citopatico.

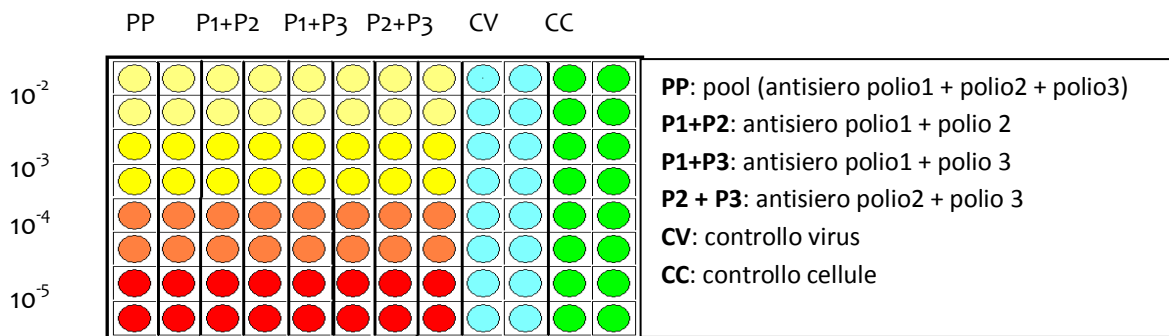


Figura 4. Tipizzazione dei poliovirus; rappresentazione schematica dell'inoculo in micropiastra

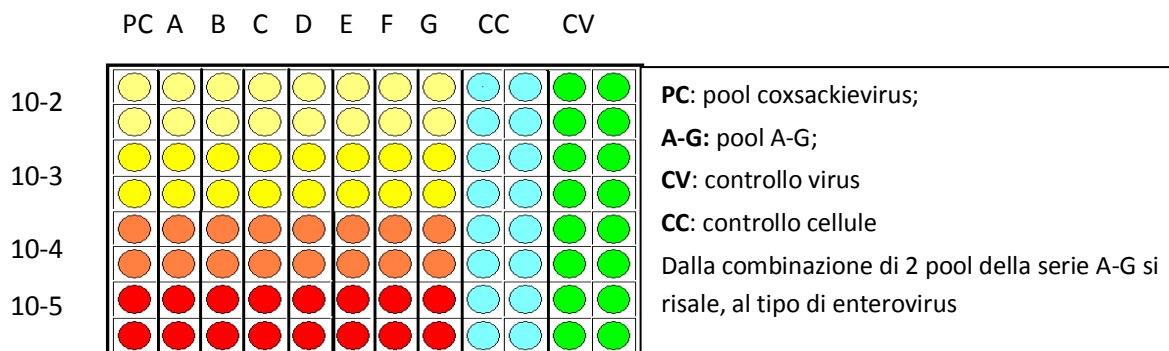


Figura 5. Caratterizzazione di enterovirus; rappresentazione schematica dell'inoculo in micropiastra

Pattern	Virus	Homologous Nt-titers	Cross-reaction
AB	ECHO 4 (Pesascek)	160- 40	
AC	ECHO 7	2560- 320	poolG: <20
AD	ECHO 11 (60-3590)	5120- 640	
AE	ECHO14	320- 160	
AF	ECHO 9 (Heyer)	40- 160	
AG	ECHO 6 (dAmori)	320- 2560	
BC	Coxsackie A9 (60-3843)	160- 20	pool A: 80, pool G: 20
BD	ECHO 1	320- 1280	Coxs B pool, pool E: 40
BE	ECHO 27	2560- 80	Coxs B pool, pool A, G: <20
BF	ECHO 3	640- 2560	pool G: <20
BG	ECHO 25	2560- 20480	pool E: <20
CD	ECHO 21	160- 160	
CE	ECHO 22	1280- 160	
CF	ECHO 2	320- 1280	pool B: 80
CG	ECHO 5	640- 320	pool E: 80
DE	ECHO 20	320- 160	Coxs B pool: <20
DF	ECHO 12	640- 160	pool B. <20
DG	ECHO 30	1280- 1280	
EF	ECHO 33	20- 80	
EG	ECHO 29 (63-6771)	640- 1280	
FG	ECHO 13	320- 2560	

Tabella 1. Pool A-G di sieri standard per la tipizzazione degli enterovirus (RIVM, Bilthoven, Olanda)

3.1.4.5 Estrazione dell'RNA virale

Per eseguire la reazione a catena della polimerasi a doppio step (Nested Polymerase Chain Reaction) per la ricerca dell'acido nucleico virale, è necessario ricavare prima l'RNA dai campioni biologici che viene in seguito retrotrascritto a cDNA, il quale viene poi amplificato.

Per l'estrazione dell'RNA virale è stato impiegato un kit commerciale ("PureLink Viral RNA/DNA Mini Kit", Invitrogen, Applied Biosystems) che permette di ottenere un RNA altamente purificato.

Questa metodica prevede l'utilizzo di particolari provette contenenti una matrice in silice. La procedura consente dopo la lisi delle particelle virali, di intrappolare l'acido nucleico nel filtro in silice tramite ripetuti lavaggi e centrifugazioni (Figura 6). L'acido nucleico virale viene eluito in 50 µl di acqua RNasi-free E3, fornita dal kit.

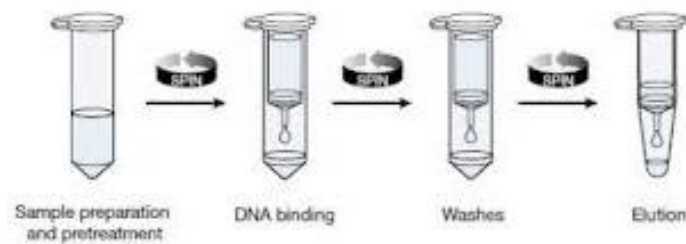


Figura 6. Metodica di estrazione dell'acido nucleico mediante adsorbimento su silice

3.1.4.6 Retrotrascrizione

La fase di amplificazione viene preceduta dalla retrotrascrizione dell'RNA, mediante l'utilizzo di primer che permette di trascrivere tutto l'RNA presente nel campione estratto in cDNA (Applied Biosystems, Random Hexamers).

La miscela di retrotrascrizione ha un volume di 10 µl ed è composta da:

- 4 µl di First-Strand Buffer 5X (250 mM Tris-HCl, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂)
- 2 µl di Ditiotreitolo, DTT, 0,1 M
- 1,5 µl di primer Random Hexamers
- 0,5 µl di una miscela di desossiribonucleosidi trifosfati, dNTPs (ciascuno: 25 mM)
- 1 µl di inibitore della ribonucleasi, RNAout (40 U/µl)
- 1 µl di trascrittasi inversa, M-MLV RT (200 U/µl)

Alla miscela così preparata vengono aggiunti 10 µl di campione estratto ottenendo quindi un volume finale di 20 µl. La reazione di retrotrascrizione viene eseguita in un termociclatore (Thermal Cycler Gene Amp PCR System 9700, Applied Biosystems) e consiste in 25 cicli comprensivi di una fase di denaturazione a 94° e una fase di appaiamento e allungamento a 68°.

3.1.4.7 Nested PCR (Nested Polymerase Chain Reaction)

Per rilevare la presenza del virus in bassa quantità o non più vitale viene eseguita la nested-PCR per la determinazione della presenza dell'acido nucleico.

Inizialmente viene eseguita una Nested PCR per la ricerca di tutti gli enterovirus, compreso il poliovirus, mediante l'utilizzo di primers (Tabella 2) le cui sequenze sono state scelte nella regione 5' non codificante altamente conservata in tutti gli enterovirus (100).

Se il campione dovesse risultare positivo per enterovirus, viene eseguita la ricerca del DNA virale di poliovirus tramite l'amplificazione di una regione del genoma altamente conservata dei poliovirus localizzata nel gene codificante per la proteina del capsido VP1.

La metodica prevede una doppia amplificazione (I step e II step), che coinvolge sequenzialmente due regioni di DNA, una interna all'altra, e richiede l'uso di una coppia di primer per ciascuno step di PCR (Tabella 3).

I STEP – primers esterni	
ENT-CX3	5' - CGGTGGCTGCGTTGGCGGCC - 3' nt 354-373
ENT-CX10	3' - ATTGTGACCATAAGCAGCCA - 3' nt 599-580
II STEP – primers interni	
ENT-CX8	3' - AAACACGGACACCCAAAGTA - 3' nt 563-544
ENT-CX9	5' - GGCCCCTGAATGCGGCTAAT - 3' nt 451-470

Tabella 2. Sequenza dei primers per la Nested PCR per la ricerca degli enterovirus

I STEP – primers esterni	
POLIO1 (Rex-VP1)	5' - CAAGAGGTCTCTATTCCACAT - 3' nt 1189-1210
POLIO2 (Fex-VP1)	5' - AGTCAATGATCACAACCC - 3' nt 915-934
II STEP – primers interni	
POLIO3 (Rin-VP1)	5' - CTTGTAACCTGCAGTGACAC - 3' 1114-1135
POLIO4 (Fin-VP1)	5' - CACGTCAGAGTCTGGTGCCC - 3' 977-997

Tabella 3. Sequenza dei primers per la Nested PCR per la ricerca dei poliovirus

La preparazione della miscela di reazione del I e del II step e l'inoculo del campione per entrambe le Nested PCR avviene come riportato in tabella 4. In una reazione di Nested PCR viene sempre allestito un controllo positivo (c+) e almeno un controllo negativo (c-).

Reagenti	Concentrazione richiesta	Quantità di reagente per provetta (volume finale mix di reazione: 50µl)
Acqua distillata sterile DNasi RNasi-free		29,1 µl per il I step 32,1 µl per il II step
PCR buffer, 10X	1 x PCR, Buffer	5µl
Primers (10 pm/ µl = 10 µM)	1 µM	5µl di ciascuno dei 2 primers
dNTPs (25 mM x nucleotide)	200 µM	0,4µl
Taq Polimerase (2 U/ µl)	1 U	0.5µl
Prodotto retrotrascrizione I amplificato		5µl* per il I step 2µl** per il II step

*prodotto della retrotrascrizione

**prodotto della prima amplificazione

Tabella 4. Composizione della miscela di reazione per il I e II step della Nested PCR

Le reazioni di amplificazione avvengono mediante un Thermal Cycler Gene Amp PCR System 9700 (Applied Biosystems) secondo le condizioni riportate nelle tabelle 5 e 6, che variano per le due Nested PCR.

N° cicli	Denaturazione	Annealing	Estensione
1	94°C x 2 min		
40	94°C x 30 sec	53°C x 30 sec	72°C x 3 sec
1			72°C x 5 min

N° cicli	Denaturazione	Annealing	Estensione
1	94°C x 2 min		
30	94°C x 30 sec	55°C x 30 sec	72°C x 30 sec
1			72°C x 5 min

Tabella 5. Condizioni di amplificazione del I e II step della Nested PCR per enterovirus

N° cicli	Denaturazione	Annealing	Estensione
1	94°C x 2 min		
35	94°C x 30 sec	60°C x 30 sec	72°C x 3 sec
1			72°C x 5 min

N° cicli	Denaturazione	Annealing	Estensione
1	94°C x 2 min		
30	94°C x 30 sec	60°C x 30 sec	72°C x 30 sec
1			72°C x 5 min

Tabella 6. Condizioni di amplificazione del I e II step della Nested PCR per poliovirus

3.1.4.8 Elettroforesi

L'evidenziazione dei prodotti di amplificazione è stata condotta tramite elettroforesi in gel di agarosio al 2% (Agar GellyPhor; Euroclone UK, Celbio) addizionato di SYBRR Safe DNA gel stain 10.000X concentrato in DMSO (Invitrogen) allo 0.01%. In ciascun pozzetto del gel sono stati seminati 10,5 µl di campione e 3,5 µl di blu di bromofenolo; parallelamente agli amplificati è stato seminato un marcatore di pesi molecolari (SharpMass, Euroclone). E' stata quindi condotta una corsa elettroforetica per un'ora con d.d.p. di 130V. I prodotti di amplificazione in cui è presente il genoma virale sono visibili sotto forma di bande fluorescenti evidenziate mediante transilluminazione con raggi UV.

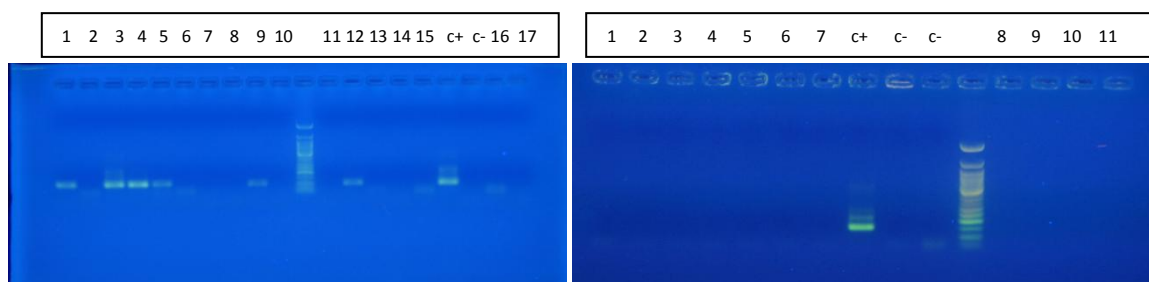


Figura 7. Corsa elettroforetica di una Nested PCR per enterovirus e l'altra per poliovirus. Nella Nested PCR per enterovirus i campioni 1-3-4-5-9-12 sono positivi per enterovirus e le bande sono alla stessa altezza del controllo positivo; tra il campione 10 e l'11 è stato seminato il marcatore di pesi molecolari. Nella Nested-PCR per poliovirus tutti i campioni sono negativi e l'unica banda è il controllo positivo

3.1.4.9 Titolazione degli anticorpi neutralizzanti

Sui campioni di siero raccolti si esegue la titolazione degli anticorpi anti-poliovirus con la tecnica di neutralizzazione in micropiastra.

Questo test permette di misurare la capacità di un siero di neutralizzare l'infettività di un virus, mediante l'utilizzo di specifici antigeni. Gli antigeni utilizzati sono gli stipiti attenuati di Sabin (L Sc 2ab per polio 1, P712 Ch 2ab per polio2 e Leon 12ab per polio3). Come substrato si utilizzano le cellule HEp-2. Ogni siero è saggiato in doppio a diverse diluizioni, da 1:4 a 1:256, per ciascuna delle quali si utilizzano 100TCID₅₀ (Tissue Culture Infectious Dose 50) di antigene. La lettura si esegue dopo 5 giorni di incubazione a 37°C. La presenza di un marcato effetto citopatico evidenzia che il poliovirus non è stato neutralizzato perché il siero non contiene anticorpi specifici; invece l'assenza del CPE indica che il poliovirus è stato neutralizzato dagli anticorpi specifici contro il poliovirus presenti nel siero analizzato.

Il titolo in anticorpi neutralizzati corrisponde quindi alla più alta diluizione di siero capace di inibire l'effetto citopatico dell'antigene almeno in uno dei due pozzetti impiegati per ciascuna diluizione.

3.1.5 Il funzionamento della rete negli anni 1997-2009

Il funzionamento della rete durante gli anni non è stato sempre ottimale. Il principale problema riscontrato è stato sicuramente la sottotitola dei casi.

In Lombardia sulla base dell'incidenza minima di 1 caso ogni 100.000 bambini di età inferiore ai 15 anni, il numero di casi atteso è variato negli anni tra gli 11 casi nel 1997 e i 14 casi nel 2009, all'aumentare della numerosità della popolazione dei bambini da 0 a 14 anni.

L'andamento delle segnalazioni dei casi di PFA è stato disomogeneo nei diversi anni, con risultati ottimali raramente ottenuti e con risultati non soddisfacenti nella maggior parte degli anni (Figura 8).

Il tasso atteso è stato raggiunto solamente in due anni: nel 2000, con 14 casi segnalati rispetto ai 12 attesi e nel 2004 con 12 casi segnalati sui 12 attesi.

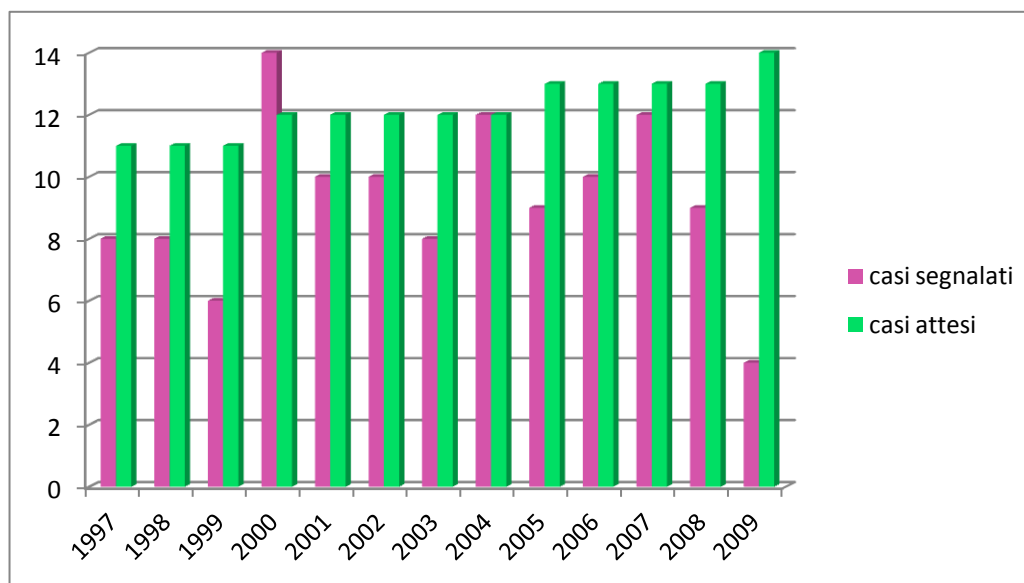


Figura 8. Andamento della sorveglianza delle PFA in Lombardia negli anni 1997-2009

Tra il 1997 e il 2002 sono stati riscontrati 6 casi positivi per poliovirus, tutti di tipo vaccinale e 4 positivi per enterovirus dalle analisi virologiche eseguite sui campioni di feci.

Un altro problema riscontrato era la persistente assenza di partecipazione di enti ospedalieri molto importanti in rapporto a dimensioni e caratteristiche, cosa che ha portato alla richiesta di più interventi da parte della Regione che con due note ha ribadito agli ospedali l'importanza di aderire alla rete di sorveglianza delle PFA. Una prima nota regionale risale al 2001 e dichiara che "La sorveglianza della PFA è un atto dovuto che si inserisce nei livelli essenziali di assistenza" (Nota 20/03/2001 H1.2001.0019576) e una seconda nota sottolinea inoltre che "Le strutture sanitarie con reparti ove possano essere ricoverati pazienti con PFA di età inferiore a 15 anni debbono aderire alla rete" (Nota 22/08/2008 H1.2008.0031963). Un'altra difficoltà incontrata riguardava l'inadeguata partecipazione degli enti aderenti alla rete evidenziata dall'irregolarità con la quale venivano inviate le segnalazioni quindicinali e dall'incompletezza che spesso riguardava le segnalazioni ricevute, per mancanza ad esempio dei campioni o dell'esecuzione del follow-up.

3.1.6 Organizzazione della rete negli anni 2010, 2011 e 2012

Nel 2010, osservata la scarsa qualità dell'andamento della sorveglianza negli anni precedenti, in particolare nel 2009 con solamente 4 casi segnalati, si è ritenuto di dover rafforzare la rete.

Il primo obiettivo è stato quello di aumentare le strutture ospedaliere partecipanti, che durante quest'anno sono state 45, grazie al reclutamento di altre 8 strutture ospedaliere rispetto alle 37 dell'anno precedente. Secondariamente si è deciso di contattare più frequentemente le strutture ospedaliere, tramite l'invio documenti riassuntivi periodici riguardanti l'andamento dell'attività della sorveglianza e i risultati riferiti ai casi PFA ricevuti ed esaminati.

Infatti, il CRR da quest'anno si impegna ad inviare, alla scadenza di ogni quadrimestre, una lettera indirizzata ai Referenti e ai Direttori Sanitari e Generali delle strutture ospedaliere aderenti alla rete

riguardo l'attività svolta. Oltre ai risultati delle indagini virologiche dei casi segnalati, viene anche inviato il prospetto delle segnalazioni quindicinali ricevute.

Inoltre a inizio anno viene inviata una lettera contenente:

- *Richiesta dell'indicazione dei referenti ospedalieri*
- *Il quadro completo della sorveglianza dell'anno precedente*
- *La scheda per l'adesione alla rete per l'anno in corso*
- *Le istruzioni per la conduzione della sorveglianza comprensive dei moduli*

Con l'ingresso nella rete anche dell'Azienda Ospedaliera della provincia di Lodi nel 2011 le strutture che hanno dichiarato la loro adesione sono state 46, con una rappresentanza nel programma di sorveglianza di tutte le dodici province lombarde. A febbraio del 2011 è stato organizzato un workshop dal titolo *"Il lungo cammino verso l'eradicazione della poliomielite"* con l'intervento della Regione Lombardia e dell'Istituto Superiore di Sanità, rivolto in particolare a tutti i referenti ospedalieri delle PFA e al personale medico e paramedico interessato nell'attività e finalizzato ad aumentare la loro sensibilizzazione e formazione.

Nel 2011 è stato inoltre introdotta l'osservazione dei casi osservati con le schede di dimissione ospedaliera (SDO) per rilevare l'eventuale presenza di casi di PFA non segnalati, come effettuato dalla Regione ed evidenziato nel corso del workshop.

Successivamente sono stati ricontattati alcuni Ospedali per richiedere l'adesione alla rete.

Nel 2012 le strutture che aderiscono alla rete sono 51, grazie al reclutamento di 6 nuovi enti ospedalieri in cui, dall'analisi delle SDO, risultavano ricoveri per paralisi flaccide acute. Oltre al richiamo delle strutture ospedaliere, per rafforzare ulteriormente la rete di sorveglianza è stato richiesto un intervento della Direzione Generale Sanità della Regione Lombardia in una riunione tenutasi presso la Regione in data 3 aprile. In seguito all'incontro la Direzione Generale Sanità ha redatto una nuova nota (nota H1.2012.0015799 del 17/5/12), in aggiunta a quelle del 2001 e del 2008, rivolta alle Direzioni Generali delle aziende ospedaliere e ai referenti presso le unità operative della rete di sorveglianza per ribadire importanza, modi e tempi della sorveglianza PFA, sottolineando ancora una volta la rilevanza della segnalazione di tutti i casi di PFA anche qualora sia già stata formulata una diagnosi che ne escluda la natura infettiva. La Regione si è inoltre resa disponibile nel permetterci il controllo periodico dei casi di PFA registrati utilizzando le SDO e a pubblicare sul sito regionale uno spazio dedicato alla sorveglianza PFA con link al nostro sito di Dipartimento che è in corso di aggiornamento per la creazione di uno spazio dedicato alla sorveglianza delle PFA con documentazione e materiale conoscitivo utile e accessibile a tutti. Il nostro gruppo, con i patrocini del Ministero della Salute, dell'ISS e dell'Università degli Studi di Milano, ha inoltre ideato un logo di identificazione per le strutture aderenti alla rete come elemento di rinforzo alla motivazione degli enti. Per facilitare la collaborazione degli enti ospedalieri è stato inoltre proposto l'invio ogni quindici giorni da parte nostra di una e-mail ai referenti che ne hanno fatto richiesta, quale promemoria del report quindicinale.

3.1.7 Casistica in studio

Tra gennaio 2010 e dicembre 2012 in Lombardia sono stati notificati 27 casi di PFA e per tutti è stato possibile analizzare due campioni di feci, tranne per un caso in cui ne è stato esaminato solamente uno.

3.2 LA SORVEGLIANZA AMBIENTALE IN LOMBARDIA

In Italia, in considerazione della scarsa qualità della sorveglianza della PFA e del rischio di importazioni di Poliovirus da altri Paesi, la sorveglianza ambientale è uno strumento molto utile per individuare un'eventuale circolazione silente di poliovirus nella popolazione.

La sorveglianza ambientale permette inoltre di riscontrare la presenza di enterovirus non-polio e quella di poliovirus vaccinale: un'eventuale loro co-circolazione, soprattutto degli Enterovirus del gruppo C (coxsackie A1, A11, A13, A17, A19-22, A24, EV-95, EV-99, EV-102) potrebbe dare origine, in seguito a ricombinazione, a ceppi virali con caratteristiche di trasmissione e neurovirulenza indistinguibili dal poliovirus selvaggio.

3.2.1 I depuratori indagati

Sulla base dei risultati ottenuti durante uno studio pilota svolto nel 2005 sono stati scelti per il prelievo dei reflui urbani due dei depuratori in cui si riversano i liquami dell'area urbana milanese (Figura 9).

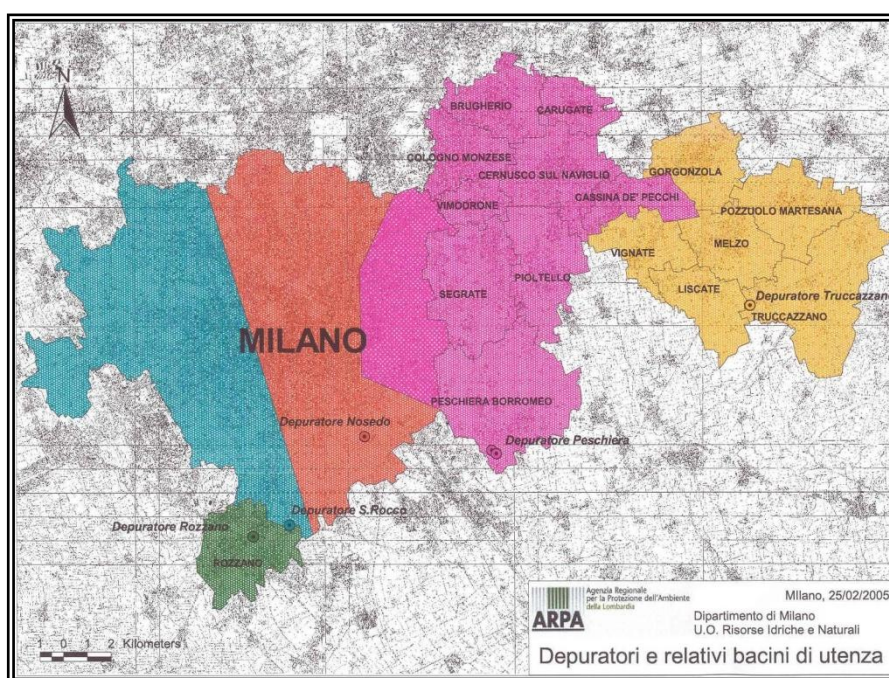


Figura 9. Depuratori della provincia di Milano e relativi bacini di utenza (fonte: ARPA Lombardia)

Per le finalità di questo studio la scelta dei depuratori si è basata principalmente sulla numerosità della popolazione servita, in quanto all'aumentare di quest'ultima diminuisce la sensibilità dell'indagine. Sono quindi stati scelti depuratori che rispondessero al criterio fissato dall'OMS di un range di popolazione ottimale compreso tra 100.000 e 300.000 abitanti.

La rete di raccolta delle acque reflue milanesi attraversa la città da nord a sud, seguendone il deflusso naturale e consente quindi di ottenere campioni rappresentativi delle varie fasce di popolazione della città coprendo circa il 40-45% del territorio.

I campionamenti sono stati effettuati, grazie alla collaborazione dell'Agenzia Regionale per la protezione dell'Ambiente (ARPA) della Lombardia, all'ingresso dei depuratori scelti:

1. Peschiera Borromeo, che raccoglie le acque provenienti dalla estrema periferia est della città, servendo circa il 15% del territorio milanese, con un bacino di circa 270.000 abitanti equivalenti.
2. Nosedo, che raccoglie le acque provenienti dalla zona centro-orientale di Milano e rappresenta il 40% circa del territorio; il campionamento viene effettuato a livello di entrambi i collettori (Nosedo e Nosedo ampliamento Est) considerata la vastità della popolazione afferente; la popolazione servita è pari a 300.000 abitanti equivalenti per ciascun collettore.

Tutti i campionamenti sono stati effettuati con periodicità quindicinale e solitamente i campioni dei due collettori di Nosedo vengono effettuati lo stesso giorno.

Come previsto dal protocollo dell'OMS (6), è stato prelevato 1 litro di liquame, risultato di un campionamento medio nelle 24 ore.

Ogni campione è stato immediatamente contrassegnato con un'etichetta recante il luogo e la data del prelievo, mantenuto a 4°C ed inviato al laboratorio di virologia al massimo entro le 24 ore.

3.2.2 Preparazione dei campioni: separazione bifasica

La metà di ciascun campione è stata conservata a -20°C, senza essere stata trattata, per un'eventuale ripetizione delle indagini.

I restanti 500 ml sono stati suddivisi in aliquote da 50 ml e centrifugati per 10 minuti a 1000g (pari a circa 2780 RPM) allo scopo di ottenere la formazione di un pellet contenente i contaminanti solidi del campione.

Il surnatante dei 10 tubi da 50 ml ottenuto è stato raccolto in una beuta da 1l mentre il pellet è stato conservato a 4°C.

È necessario che il pH del surnatante sia portato a valori di neutralità (7-7,5) utilizzando soluzioni di NaOH 1N o di HCl 1N.

Al contenuto della beuta sono stati aggiunti:

- 39,5 ml di destrano al 22% (FLUKA);
- 287 ml di PEG 6000 (PolyEthylene Glicol) al 29% (FLUKA);
- 35 ml di NaCl 5N.

La soluzione così ottenuta è stata mantenuta in agitazione costante per un'ora a 4°C utilizzando un agitatore magnetico ed è successivamente stata trasferita in un imbuto separatore conico (Nalgene), da 1 l, munito di rubinetto e di supporto e quindi lasciata over-night a 4°C.

Il principio della separazione bifasica si basa sulla diversa densità dei due polimeri (PEG e Destrano) che induce la formazione di due fasi distinte separate da un'interfase nella più bassa delle quali gli enterovirus si accumulano.

Il giorno seguente sono stati raccolti goccia a goccia in una provetta da centrifuga sterile in polipropilene resistente al cloroformio (Sterilin), sia lo strato inferiore sia l'interfase.

Da un volume iniziale di 500 ml di campione si ricavano in media 10 ml di concentrato.

I pellet ottenuti dalla centrifugazione del giorno precedente e conservati sono stati aggiunti al concentrato ottenuto.

Alla soluzione è stato addizionato cloroformio (>99.8%) in volume pari al 50% del volume totale e dopo essere stata agitata energicamente per un minuto la soluzione è stata centrifugata a 1000 g a 4°C per 30 minuti.

Il surnatante ottenuto è stato sottoposto al medesimo trattamento con un volume di cloroformio pari al 20% del totale. Tale trattamento è utile per rimuovere alcuni batteri, funghi e lipidi citotossici.

La fase acquosa superiore ricavata è stata raccolta in un tubo sterile da 15 ml (Iwaki) dove sono stati aggiunti antibiotici (penicillina e streptomina alle concentrazioni rispettive di 3,121 gr per 100 ml e 2 gr per 100 ml) in volume pari al 10% del volume totale.

Il campione è stato conservato a 4°C per un'ora in modo da favorire l'azione degli antibiotici prima di procedere all'inoculo in colture cellulari. Il rimanente è stato suddiviso in aliquote da 2 ml e conservato a -20°C per eventuali successive investigazioni.

Tutte le fasi manuali di lavorazione dei campioni sono state effettuate sotto cappa a flusso laminare di classe II, sia per preservare la sicurezza dell'operatore sia per evitare le contaminazioni crociate possibili fra campioni diversi, dato che questo tipo di procedura può generare aerosol.

3.2.3 Metodi virologici

Per condurre le analisi dei campioni ambientali sono state seguite le "Guidelines for environmental surveillance of poliovirus circulation", pubblicate dall'OMS nel 2003 (6). Le linee guida dell'OMS consigliano un programma regolare di campionamenti che preveda prelievi almeno mensili.

A causa del possibile rischio di ricombinazione tra poliovirus ed enterovirus non-polio si è ritenuto utile impostare lo studio in modo da poter valutare, parallelamente alla presenza di poliovirus nei campioni, anche la presenza di altri enterovirus.

Per concentrare i campioni di liquame e migliorare la sensibilità di determinazione del virus è stato utilizzato il metodo di "separazione bifasica", riportato nelle linee guida dell'OMS (6).

Per quanto riguarda le metodiche per le indagini virologiche sono le stesse utilizzate per i campioni biologici:

- L'isolamento in colture cellulari RD ed L20b (paragrafo 3.1.4.2)
- Nested-PCR per enterovirus e poliovirus per la determinazione della presenza dell'RNA virale (paragrafo 3.1.4.7)

3.2.4 Il funzionamento della rete negli anni 2006-2009

In tutti gli anni è stata riscontrata un'elevata presenza di enterovirus non-polio nei reflui urbani dei tre collettori (Tabella 7), con una percentuale di positività dal 2006 al 2009 rispettivamente di 75%, 52%, 91% e 78%.

Liquami	2006	2007	2008	2009
Liquami EV+	38 (75%)	36 (52%)	63 (91%)	54 (78%)
Liquami EV-	13 (25%)	33 (48%)	6 (9%)	15 (22%)
Totale	51 (100%)	69 (100%)	69 (100%)	69 (100%)

Tabella 7. Prevalenza di liquami positivi per enterovirus negli anni 2006-2009

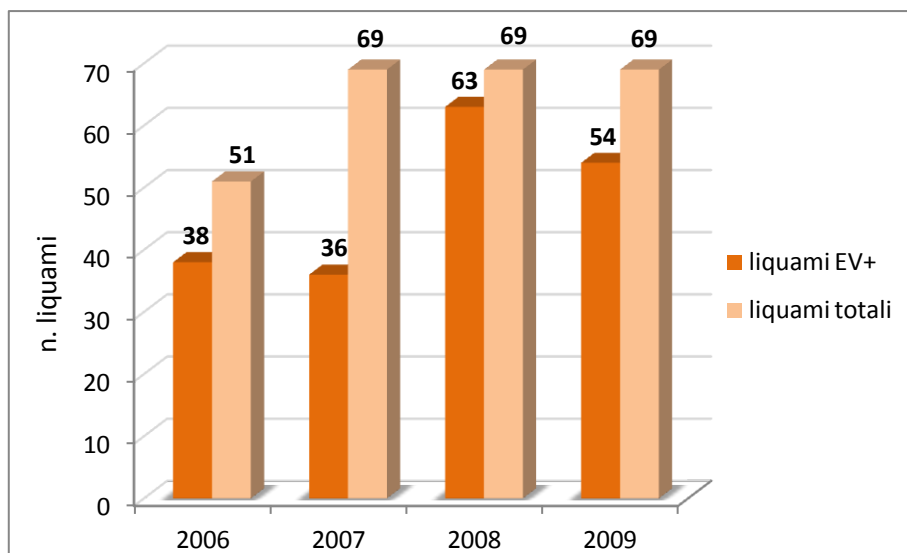


Figura 10. Prevalenza degli enterovirus non-polio isolati in coltura cellulare RD, 2006-2009

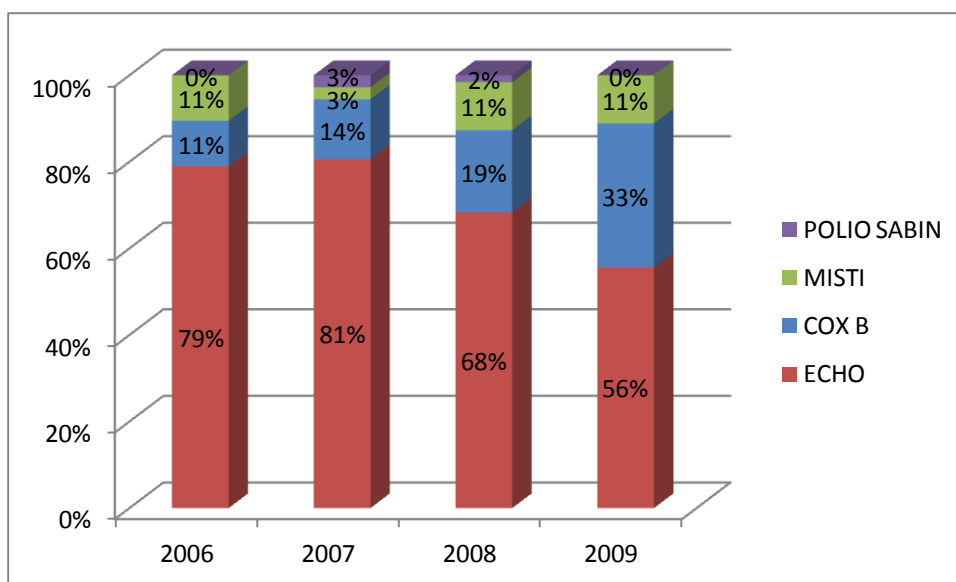


Figura 11. Enterovirus non-polio nei liquami, 2006-2009

La presenza di poliovirus vaccinale Sabin-like ritrovato nel 2007 e nel 2008 nei reflui urbani potrebbe essere dovuta a soggetti che erano stati recentemente vaccinati in Paesi esteri con OPV (vaccino orale attenuato) o all'importazione di virus vaccinali da parte di immigrati che avevano avuto stretti contatti nel Paese d'origine con persone recentemente vaccinate

3.2.5 Campioni di liquame oggetto dello studio

Per questo lavoro di tesi sono stati raccolti, nel corso del triennio 2010-2012, 185 campioni così distribuiti: 64 nel 2010, 69 nel 2011 e 52 nel 2012.

4. RISULTATI

4.1 SORVEGLIANZA DELLE PARALISI FLACCIDE ACUTE (PFA)

4.1.1 Risultati della sorveglianza delle PFA nel 2010

Grazie al controllo più rigido della rete intrapreso quest'anno si è riscontrato un aumento delle adesioni delle strutture ospedaliere alla rete, con 45 Presidi Ospedalieri appartenenti a 29 Aziende Ospedaliere, e un buon numero di casi segnalati.

Per quanto le segnalazioni quindicinali, queste sono risultate piuttosto regolari con 23 presidi ospedalieri su 45 (51%) che hanno inviato il report anche di “zero casi” in percentuale $\geq 80\%$. Inoltre delle restanti 22 strutture:

- ✓ 7 hanno inviato i report quindicinali in modo comunque piuttosto regolare con invio puntuale in almeno il 50% dei casi
- ✓ 15 non hanno inviato i report quindicinali o li hanno inviati in ritardo in più del 50% degli invii

I casi segnalati nel 2010 sono stati 12 e provenivano da 6 strutture ospedaliere appartenenti a 8 province lombarde e la maggior parte dei casi erano ricoverati presso i reparti di Pediatria (Tabella 1).

In quasi la metà dei casi la diagnosi iniziale era la Sindrome di Guillain-Barré, individuata, infatti, in 5 degli 12 casi (42%).

Le segnalazioni erano distribuite nei 12 mesi dell'anno e comprendevano anche due casi segnalati a gennaio 2011 i cui sintomi erano insorti a dicembre 2010.

Di tutti è stato possibile analizzare almeno un campione di feci o il tampone rettale, che in 8 casi sono stati prelevati entro i 14 giorni previsti dall'esordio della paralisi e solo in 1 caso (6/10) sono stati prelevati a una distanza maggiore rispetto alle 24-48 ore previste (Tabella 2). In otto casi sono stati analizzati anche altri campioni, di liquor e/o tampone faringeo (Tabella 2). In due casi non essendo nota la data di esordio (6/10) o la data di prelievo (10/10) delle feci non si può risalire ai tempi di prelievo. Nessun campione è risultato positivo per poliovirus; 3 casi sono stati riscontrati positivi per enterovirus non-polio sulle feci (3/10, 6/10 e 11/10) e 2 sindromi di Guillain-Barré per adenovirus (1/10 e 12/10), sempre solo sulle feci. Tutti i risultati sono stati confermati in Nested PCR.

Per quanto riguarda le titolazioni anticorpali eseguite sui campioni di siero i dati sono riportati in tabella 2. I casi 2/10, 6/10 e 11/10 risultano non sufficientemente protetti rispettivamente per polio 1, polio 2 e polio3, ma tutti e 3 i bambini devono ancora ricevere una dose di vaccino: i casi 2/10 e 11/10 hanno ricevuto tre dosi di IPV, in linea con il calendario vaccinale e del caso 6/10 lo stato vaccinale non è noto, ma il bambino ha 13 mesi quindi dovrebbe averne ricevute tre. Anche del caso 9/10 la storia vaccinale non è stata fornita, ma il soggetto risulta protetto per poliovirus. Gli altri 8 casi, che risultano protetti, hanno effettuato la vaccinazione prevista dal calendario vaccinale, anche se di 1 caso (PFA 03/10) è stata segnalata la vaccinazione in Bangladesh in assenza di una precisa documentazione di vaccinazione e una somministrazione di IPV.

È stato eseguito il follow-up di 11 dei 12 casi e la maggior parte (7/12) sono stati classificati come sindrome di Guillain-Barr (Tabella 12); è stata quindi raggiunta la percentuale attesa di almeno l'80% dei casi con follow up.

Sono inoltre stati segnalati due casi di adulti, uno di sindrome di Guillain-Barré proveniente dal Reparto di Neurologia dell'Ospedale di Saronno e l'altro era un paziente con tetraparesi flaccida acuta del Reparto di Rianimazione dell'Ospedale Bolognini di Seriate; inoltre l'Ospedale di Cremona ha segnalato un caso di un bambino di 75 giorni con atrofia muscolare spinale (SMA). Tutti i tre casi sono stati scartati dall'ISS in quanto rispettivamente per età e diagnosi non rientravano nella definizione di caso.

Caso	Sesso	Data nascita	Vaccinazioni	Diagnosi iniziale	Data esordio	Data segnalazione	Ospedale	Reparto
PFA 1/10	M	1-mar-08	si - 3 IPV	Sindrome di Guillain-Barré	6-gen-10	19-gen-10	Policlinico cl. De Marchi (MI)	Pediatria
PFA 2/10	F	22-mar-08	si - 3 IPV	Polioradicoloneurite	25-gen-10	8-feb-10	Riuniti di Bergamo (BG)	Pediatria
PFA 3/10	F	16-feb-01	extra CE Bangladesh + 1 IPV	Paraplegia acuta	9-mar-10	9-mar-10	Spedali Civili (BS)	Neuropsichiatria infantile
PFA 4/10	F	21-mag-95	si - 4 IPV	Sindrome di Guillain-Barré	2-apr-10	21-apr-10	Osp. di Saronno (VA)	Pediatria
PFA 5/10	F	16-feb-97	si - 4 OPV	Sindrome di Guillain-Barré	17-apr-10	21-apr-10	Buzzi (MI)	Pediatria
PFA 6/10	M	27-apr-09	non noto	Paralisi flaccida di ndd	non nota	19-mag-10	Sant'Anna (CO)	Pediatria
PFA 7/10	M	18-ott-99	si - 3 IPV+1IPV	Cavitazione siringomielia del midollo dorsale distale	28-ago-10	2-set-10	Riuniti di Bergamo (BG)	Pediatria
PFA 8/10	M	24-lug-99	si - 2 IPV+2OPV	Sindrome di Guillain-Barré	19-ago-10	27-ago-10	Osp. di Saronno (VA)	Pediatria
PFA 9/10	M	25-apr-09	non noto	Impotenza funzionale arto sup dx	8-ott-10	22-ott-10	San Paolo (MI)	Pediatria
PFA 10/10	F	10-nov-01	si	Polinevrite infettiva acuta (EBV+)	16-dic-10	7-gen-11	Osp. Di Cremona (CR)	Pediatria
PFA 11/10	M	28-lug-06	si, 3 IPV	Neuropatia demielinizzante	23-dic-10	30-dic-10	Spedali Civili (BS)	Neuropsichiatria infantile
PFA 12/10	F	8-ott-08	si- 3 IPV	Sindrome di Guillain-Barré	23-dic-10	3-gen-11	Riuniti di Bergamo (BG)	Pediatria

Tabella 1. Dati anagrafici e relativi alle segnalazioni dei casi del 2010

Caso	Campioni di feci	Altri campioni	Esiti virologici	Campioni di siero	Esiti sierologici			Follow up
					PV1	PV2	PV3	
PFA 1/10	1° 19/01/10 2° 20/01/10	NO	POS ADV	1° 21/01/10	1° 1:4096	1° >1:4096	1° >1:4096	NO
PFA 2/10	1° 09/02/10 TR 2° 11/02/10	TF	NEG	1° 09/02/10 2° 01/03/10	1° 1:4 2° 1:32	1° 1:2048 2° 1:128	1° 1:1024 2° 1:16	02/04/10 Sindrome di Guillain-Barré
PFA 3/10	1° 14/03/10 2° 16/03/10	TF	POS EV non-polio	1° 09/03/10 2° 24/03/10	1° 1:2048 2° 1:1024	1° 1:2048 2° 1:1024	1° 1:1024 2° 1:1024	10/5/10 Sindrome di Guillain-Barré
PFA 4/10	1° 19/04/10 2° 20/04/10	NO	NEG	1° 21/04/10 2° 07/05/10	1° 1:64 2° 1:64	1° 1:128 2° 1:256	1° 1:16 2° 1:32	07/04/11 Sindrome di Guillain-Barré
PFA 5/10	1° 20/04/10 2° 21/04/10	NO	NEG	1° 21/04/10 2° 06/05/10	1° 1:512 2° 1:512	1° 1:1024 2° 1:512	1° 1:512 2° 1:1024	10/06/10 Possibile disturbo somatoforme associato
PFA 6/10	1° 14/05/10 2° 19/05/10	L	POS EV non-polio	1° 14/05/10	1° 1:16	1° <1:4	1° 1:16	Non eseguito, deceduto il 20/05/10 per tumore teratoide atipico rabdoide
PFA 7/10	1° 02/09/10 2° 03/09/10	L, TF	NEG	1° 02/09/10 2° 15/09/10	1° 1:64 2° 1:64	1° 1:256 2° 1:256	1° 1:512 2° 1:1024	09/11/10 Mieloradicolite
PFA 8/10	1° 30/08/10 2° 31/08/10	L, TF	NEG	1° 25/08/10 2° 15/09/10	1° 1:16 2° 1:32	1° 1:64 2° 1:128	1° 1:32 2° 1:128	24/11/10 Sindrome di Guillain-Barré
PFA 9/10	1° 22/10/10 2° 23/10/10	TF	NEG	1° 22/10/10	1° 1:128	1° 1:256	1° 1:128	13/12/10 Stiramento del plesso brachiale dx
PFA 10/10	1° non noto	NO	NEG	NO	NO	NO	NO	10/03/11 Sindrome di Guillain-Barré
PFA 11/10	1° 30/12/10 2° 01/01/11	L, TF	POS EV non-polio	1° 30/12/10 2° 14/01/11	1° 1:512 2° 1:512	1° 1:1024 2° 1:1024	1° 1:4 2° 1:16	02/03/11 Sindrome di Guillain-Barré
PFA 12/10	1° 04/01/11 2° 05/01/11	TF	POS ADV	1° 04/01/11 2° 21/01/11	1° 1:1024 2° 1:512	1° 1:1024 2° 1:512	1° 1:64 2° 1:16	11/03/11 Sindrome di Guillain-Barré

Tabella 2. Esiti delle indagini virologiche sui campioni biologici e del follow-up relativi ai casi segnalati nel 2010

4.1.2 Risultati della sorveglianza delle PFA nel 2011

Per quanto riguarda le segnalazioni quindicinali comprensiva anche delle segnalazione dei “zero casi”, nel complesso la situazione risulta analoga all’anno precedente. Sono risultate piuttosto regolari con 25 presidi ospedalieri su 46 (54%) che hanno inviato il report anche di “zero casi” in percentuale $\geq 80\%$. Inoltre delle restanti 21 strutture:

- ✓ 7 hanno inviato i report quindicinali in modo comunque piuttosto regolare con invio puntuale in almeno il 50% dei casi
- ✓ 14 non hanno inviato i report quindicinali o li hanno inviati in ritardo in più del 50% degli invii

Nel 2011 sono stati segnalati ed esaminati solamente 4 casi, 2 a inizio anno e 2 nel mese di novembre, provenienti dai Reparti di Pediatria di 4 diversi Ospedali delle province di Como e Milano (Tabella 3).

Dei 4 bambini è stato possibile raccogliere e analizzare i due campioni di feci, ma per il caso 1/11 il prelievo dei 2 campioni è stato eseguito lo stesso giorno e per il caso 2/11 i campioni sono stati prelevati a una distanza superiore alle 24-48 ore previste (Tabella 4).

Dalle prove di isolamento in coltura cellulare, in nessun caso è stata riscontrata la presenza di poliovirus, né di altri enterovirus non-polio (Tabella 4); il dato è stato confermato dagli esiti degli esami di biologia molecolare (Nested PCR). Oltre alle feci per due pazienti è stato possibile raccogliere sia il tampone faringeo (TF) che un campione di liquor (L), confermati negativi.

Per quanto riguarda le titolazioni anticorpali effettuate sui campioni di siero, due casi (PFA 2/11 e 3/11) sono risultati in possesso degli anticorpi neutralizzanti i tre sierotipi virali; in entrambi i casi non è stato rilevato un aumento rilevante del titolo anticorpale tra il primo e il secondo campione di siero, ma del caso PFA 3/11 non è noto lo stato vaccinale in quanto il bambino è straniero e il suo libretto era in Pakistan, mentre il caso PFA 2/11 risulta aver ricevuto tre dosi di IPV. Di un caso (PFA 1/11) non sono pervenuti i campioni di siero, ma dai dati anagrafici il bambino risulta regolarmente vaccinato e di un caso (PFA 4/11) è stato possibile analizzare un solo campione di siero che ha evidenziato la presenza di titoli sufficientemente protettivi verso i tre poliovirus e il bambino infatti risultava aver ricevuto le 4 dosi di vaccino richieste secondo il calendario vaccinale.

Nei quattro casi la diagnosi iniziale era la Sindrome di Guillain-Barré, ed è stata confermata tale a 60-90 giorni in tutti e quattro i casi, permettendo di ottenere il follow up nel 100% dei casi.

Sono stati inoltre raccolte le segnalazione di otto casi di PFA in adulti.

Il numero dei casi segnalati durante il 2011 risulta molto inferiore all'atteso di 14 casi.

La scarsa qualità della conduzione dell'attività di sorveglianza è anche evidente dal confronto retrospettivo effettuato utilizzando le Schede di Dimissione Ospedaliera (SDO) con codice ICD9-CM 3570, che ha evidenziato che non sono stati segnalati 7 casi di sindrome di Guillain-Barré. È comunque da sottolineare che, durante il 2011 i casi di PFA da Guillain-Barré codificati dalle SDO sono diminuiti rispetto al 2010.

Caso	Sesso	Data nascita	Vaccinazione	Diagnosi iniziale	Data esordio	Data segnalazione	Ospedale	Reparto
PFA 1/11	M	26-apr-08	sì	Sindrome di Guillain Barré	4-gen-11	20-gen-11	Sacra famiglia di Erba (CO)	Pediatria
PFA 2/11	M	18-ago-05	sì - 3 IPV	Sindrome di Guillain Barré	28-mar-11	04-apr-11	Sant'Anna (CO)	Pediatria
PFA 3/11	F	11-mag-07	non noto (libretto vaccinale in Pakistan)	Sindrome di Guillain Barré	30-ott-11	04-nov-11	Guido Salvini di Garbagnate (MI)	Pediatria
PFA 4/11	M	24-gen-99	sì - 4 OPV	Sindrome di Guillain Barré	14-nov-11	23-nov-11	Vimercate (MI)	Pediatria

Tabella 3. Dati anagrafici e relativi alle segnalazioni dei casi del 2011

Caso	Campioni di feci	Altri campioni	Esiti virologici	Campioni di siero	Esiti sierologici			Follow up
					PV1	PV2	PV3	
PFA 1/11	1° 14/01/2011 2° 14/01/2011	no	neg	no	no	no	no	20/04/11 Sindrome di Guillain-Barré
PFA 2/11	1° 05/04/2011 2° 09/04/2011	TF, L	neg	1° 05/04/2011 2° 15/04/2011	1° 1:2048 2° 1:2048	1° 1:512 2° 1:512	1° 1:1024 2° 1:2048	02/08/11 Sindrome di Guillain-Barré
PFA 3/11	1° 03/11/2011 2° 04/11/2011	no	neg	1° 30/10/2011 2° 14/11/2011	1° 1:1024 2° 1:2048	1° 1:256 2° 1:512	1° 1:256 2° 1:256	10/02/12 Sindrome di Guillain-Barré
PFA 4/11	1° 23/11/2011 2° 24/11/2011	TF, L	neg	1° 23/11/2011	1° 1:256	1° 1:256	1° 1:256	10/02/12 Sindrome di Guillain-Barré

Tabella 4. Esiti delle indagini virologiche sui campioni biologici e del follow-up relativi ai casi segnalati nel 2011

4.1.3 Risultati della sorveglianza delle PFA nel 2012

Per quanto riguarda le segnalazioni quindicinali comprensive anche delle segnalazione dei “zero casi”, nel complesso la situazione risulta migliorata rispetto l’anno precedente. Infatti, non considerando la seconda quindicina del mese di dicembre per cui la consegna del report è ancora in corso, 32 presidi ospedalieri su 51 (63%) hanno inviato il report anche di “zero casi” in percentuale $\geq 80\%$. Inoltre delle restanti 19 strutture:

- ✓ 6 hanno inviato i report quindicinali in modo comunque piuttosto regolare con invio puntuale in almeno il 50% dei casi
- ✓ 13 non hanno inviato i report quindicinali o li hanno inviati in ritardo in più del 50% degli invii

Nel 2012 sono stati segnalati 11 casi, provenienti da 8 Ospedali delle province di Bergamo, Brescia, Como, Cremona, Lecco, Milano e Varese (Tabella 5). I casi sono stati osservati nei reparti di pediatria, terapia intensiva pediatrica, neuropsichiatria infantile e rianimazione.

La diagnosi di Guillain-Barré non è più prevalente rispetto alle altre paralisi flaccide acute; si osserva, infatti, che solo il 27% dei casi (3 casi su 11) presentano questa prognosi.

Quasi la metà delle segnalazioni (45%) sono pervenute nel mese di ottobre.

Per tutti è stato possibile analizzare due campioni di feci o i tamponi rettali, che in 8 casi sono stati raccolti entro i 14 giorni previsti dall’esordio dei sintomi (Tabella 6); inoltre in un solo caso (3/12) il secondo prelievo è stato effettuato a una distanza superiore alle 24-48 ore previste. In 3 casi sono stati raccolti altri campioni (1/12, 5/12 e 10/12). Dalle analisi virologiche 1 caso (PFA 4/12) è risultato positivo per enterovirus non-polio su entrambi i campioni di feci, sia in isolamento cellulare sia in nested-PCR; il caso 10/12 è risultato negativo in isolamento cellulare, ma in Nested PCR è risultato positivo sul campione di liquor e sul primo prelievo di feci. Le feci di un paziente (6/12) sono risultate positive per adenovirus; l’indagine è stata eseguita poiché in isolamento si osservava un effetto citopatico non caratteristico degli enterovirus e la positività per adenovirus è stata ottenuta tramite una Real-time PCR. Nessun campione è stato riscontrato positivo per poliovirus, sia in isolamento che in Nested PCR.

In un caso è stato possibile analizzare solamente un campione di siero, mentre negli altri casi sono stati esaminati 2 campioni di siero e in nessun caso è stato osservato un aumento notevole dei titoli

anticorpali nel secondo siero rispetto al primo. Per quanto concerne le titolazioni anticorpali effettuate sui campioni di siero, i titoli risultano compatibili con il numero e il periodo delle somministrazioni di vaccino ricevute e le vaccinazioni risultano effettuate regolarmente secondo il calendario vaccinale. Un caso (2/12) risulta non sufficientemente protetto, poiché avendo un'età di 3 mesi ha effettuato una sola somministrazione.

Per quanto riguarda il follow up, deve ancora essere effettuato per quattro casi, per due dei quali non è stata ancora raggiunta la data di esecuzione.

Sono stati inoltre segnalati tre casi di PFA in adulti: due casi di Guillain-Barré di adulti ricoverati al Policlinico di Milano e un paziente con paraparesi flaccida dell'Ospedale di Circolo e Fondazione Macchi. Recentemente sono stati contattati telefonicamente e/o via a-mail gli Ospedali in cui dalle SDO risultavano dei casi di Sindrome di Guillain-Barré (che a settembre erano solo 2) o di plegie che non erano stati segnalati e quelli che inviavano in modo irregolare le segnalazioni quindicinali "zero casi".

Caso	Sesso	Data nascita	Vaccinazione	Diagnosi iniziale	Data esordio	Data segnalazione	Ospedale	Reparto
PFA 1/12	M	15-apr-04	sì - 4 IPV	Sindrome di Guillain-Barré	26-mar-12	30-mar-12	Spedali Civili (BS)	Neuropsichiatria infantile
PFA 2/12	F	13-nov-11	sì - 1 IPV	Ipotonia generalizzata con insuff. respiratoria	9-mar-12	17-apr-12	Riuniti di Bergamo (BG)	Terapia intensiva pediatrica
PFA 3/12	M	11-mar-08	sì - 3 IPV	Stroke ischemico dell'arteria cerebrale media dx	29-mag-12	5-giu-12	Manzoni (LC)	Pediatria
PFA 4/12	M	17-mag-07	sì - 4 IPV	Poliradicoloneurite infiammatoria	18-giu-12	20-giu-12	Spadali Civili (BS)	Neuropsichiatria infantile
PFA 5/12	M	17-lug-98	sì - 4 IPV	Sindrome di Guillain-Barré	23-giu-12	2-lug-12	Sant'Anna (CO)	Rianimazione
PFA 6/12	F	3-nov-11	sì - 2 IPV	Mielite	1-set-12	4-ott-12	Besta (MI)	Neuropsichiatria infantile
PFA 7/12	F	5-mag-98	sì - 4 IPV	Mielite demielinizzante ndd	2-ott-12	3-ott-12	Desio (MI)	Pediatria
PFA 8/12	M	17-ago-98	sì	Mieloradicolite acuta	2-ott-12	9-ott-12	Riuniti di Bergamo (BG)	Pediatria
PFA 9/12	F	31-mar-03	sì - 4 IPV	Paralisi flaccida arti inferiori	10-set-12	17-ott-12	Del Ponte (VA)	Pediatria
PFA 10/12	M	20-apr-09	sì - 3 IPV	Sindrome di Guillain-Barré	23-ott-12	31-ott-12	Cremona (CR)	Pediatria
PFA 11/12	M	30-lug-09	sì - 3 IPV	Monoplegia acuta arto superiore dx	7-nov-12	17-nov-12	Riuniti di Bergamo (BG)	Pediatria

Tabella 5. Dati anagrafici e relativi alle segnalazioni dei casi del 2012

Caso	Campioni di feci	Altri campioni	Esiti virologici	Campioni di siero	Esiti sierologici			Follow up
					PV1	PV2	PV3	
PFA 1/12	1° 30/03/12 2° 31/03/12	TF, L	neg	1° 30/03/12 2° 14/04/12	1° 1:256 2° 1:128	1° 1:128 2° 1:64	1° 1:128 2° 1:128	28/05/12 Sindrome di Guillain-Barré
PFA 2/12	1° 18/04/12 2° 19/04/12	NO	neg	1° 18/04/12 2° 02/05/12	1° <1:4 2° 1:4	1° <1:4 2° 1:4	1° 1:8 2° 1:32	15/05/12 SMARD tipo 1
PFA 3/12	1° 02/06/12 2° 05/06/12	NO	neg	1° 02/06/12 2° 22/06/12	1° 1:256 2° 1:256	1° 1:64 2° 1:64	1° 1:32 2° 1:32	18/10/12 Stroke ischemico di origine vasculopatica
PFA 4/12	1° 19/06/12 2° 20/06/12	NO	EV+	1° 02/06/12 2° 05/07/12	1° >1:256 2° >1:256	1° >1:256 2° >1:256	1° >1:256 2° >1:256	10/08/12 Sindrome di Guillain-Barré
PFA 5/12	1° 02/07/12 2° 03/07/12	L	neg	1° 27/06/12 2° 11/07/12	1° 1:128 2° 1:256	1° 1:128 2° 1:256	1° 1:64 2° 1:64	01/08/12 Sindrome di Guillain-Barré
PFA 6/12	1° 04/10/12 2° 05/10/12	NO	adeno+	1° 05/09/12 2° 04/10/12	1:128 1:128	>1:256 >1:256	>1:256 >1:256	in corso
PFA 7/12	TR:1° 03/10/12 TR:2° 04/10/12	NO	neg	1° 03/10/12 2° 23/10/12	1:256 1:128	>1:256 >1:256	1:32 1:32	in corso
PFA 8/12	1° 09/10/12 2° 10/10/12	NO	neg	1° 10/10/12 2° 26/10/12	1:128 1:128	>1:256 >1:256	1:32 1:32	29/11/12 Mielite trasversa
PFA 9/12	TR:1° 17/10/12 TR:2° 17/10/12	NO	neg	17/10/2012	1:128	1:128	1:8	05/10/2012 Astrocitoma picomixioide
PFA 10/12	1° 31/10/12 2° 02/11/12	TF, L	PCR EV+ su L e F1°	1° 31/10/12 2° 14/11/12	>1:512 1:512	>1:512 1:512	>1:512 >1:512	in corso
PFA 11/12	1° 17/11/12 2° 19/11/12	NO	neg	1° 17/11/12 2° 03/12/12	1:256 1:256	>1:512 >1:512	1:128 1:128	in corso

Tabella 6. Esiti delle indagini virologiche sui campioni biologici e del follow-up relativi ai casi segnalati nel 2012

4.1.4 Attività di sorveglianza nel triennio 2010-2012

I dati anagrafici dei casi con paralisi flaccida acuta sono riportati in tabella 7.

Considerando i tre anni l'andamento dei casi nei diversi mesi dell'anno ha evidenziato il maggior numero dei casi nel mese di ottobre (Figura 1).

Le notifiche ricevute durante il triennio in esame sono state effettuate da 15 diversi Ospedali (Figura 3) appartenenti a 7 province lombarde (Figura 2) e la maggior parte sono state eseguite dall'Ospedale Riuniti di Bergamo. 20 delle 27 notifiche provenivano dai Reparti di Pediatria (Figura 4) e per il 44 % (12/27) dei casi la diagnosi iniziale era la Sindrome di Guillain-Barré.

Come si osserva dalla Tabella 8, nei tre anni di sorveglianza oggetto dello studio non è stato mai raggiunto il numero dei casi attesi.

Nel complesso l'attività di sorveglianza nei tre anni non è stata molto buona se si analizzano gli indicatori di performance (Tabella 9).

Anno	n. casi	Età media* (anni)	Sesso		Vaccinazione		
			Maschi	Femmine	sì	no	Non noto
2010	12	6,7	6 (50%)	6 (50%)	10 (83%)	0 (0%)	2 (17%)
2011	4	6,4	3 (75%)	1 (25%)	3 (75%)	0 (0%)	1 (25%)
2012	11	4,1	7 (64%)	4 (36%)	11 (100%)	0 (0%)	0 (0%)
Totale	27	5,7	16 (63%)	11 (37%)	24 (86%)	0 (0%)	3 (14%)

*calcolata come media di età in mesi, ma espressa in anni

Tabella 7. Dati anagrafici relativi ai casi di PFA del triennio 2010-2012

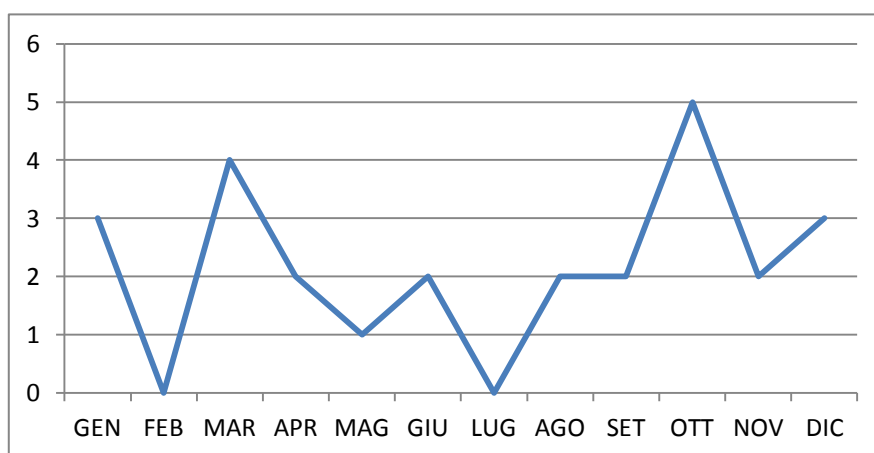


Figura 1. Andamento mensile dei casi del triennio 2010-2012

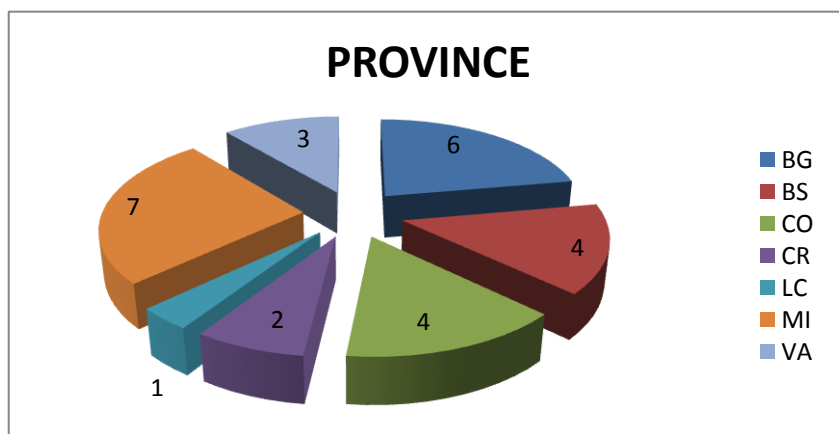


Figura 2. Distribuzione per province dei casi di PFA del triennio 2010-2012

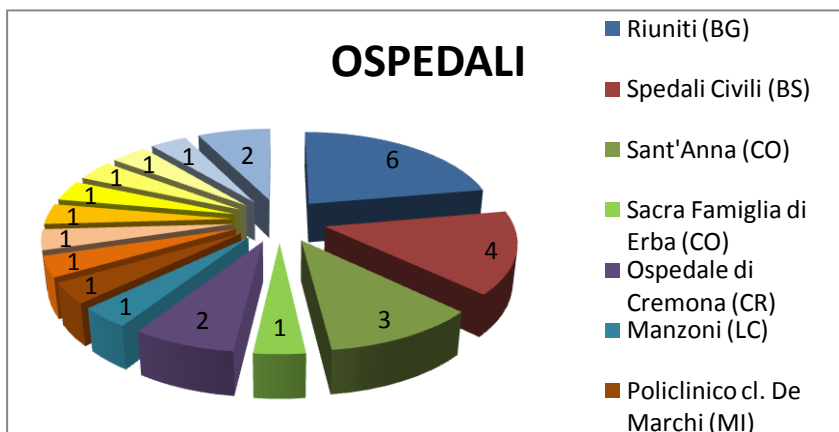


Figura 3. Ospedali che hanno segnalato i casi di PFA del triennio 2010-2012

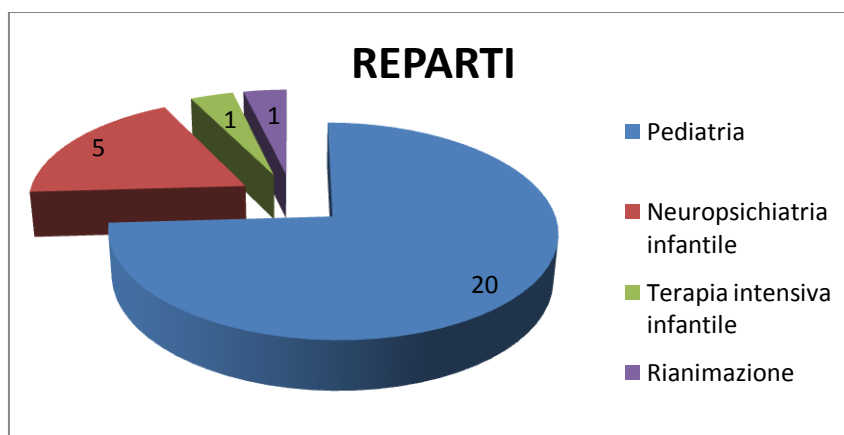


Figura 4. Reparti ospedalieri nei quali erano ricoverati i casi di PFA del triennio 2010-2012

Anno	Casi attesi	Casi segnalati	Incidenza
2010	14	12	0,9
2011	14	4	0,3
2012	14	11	0,8

Tabella 8. Casi attesi e segnalati nel triennio 2010-2012

INDICATORE	Atteso	2010	2011	2012
% PFA con 2 campioni di feci entro 14 gg	≥80%	58%	100%	73%
% PFA con 1 campione di feci entro 14 gg	≥80%	67%	100%	73%
% casi segnalati entro 7 gg dall'inizio sintomi	≥90%	33%	50%	54%
% PFA con follow-up a 60-90 gg dall'inizio sintomi	≥80%	92%	100%	64%*

*i dati sono aggiornati al mese di dicembre

Tabella 9 . Alcuni indicatori di performance: individuazione e indagine dei casi nel triennio 2010-2012

4.2 SORVEGLIANZA AMBIENTALE

4.2.1 Sorveglianza ambientale

La sorveglianza ambientale della circolazione di poliovirus ed enterovirus non-polio, mediante l'analisi di campioni di liquame fognario di Milano, è stata condotta avvalendosi dell'isolamento virale in coltura cellulare. I risultati sono stati confermati in Nested PCR e gli isolati in coltura cellulare risultati positivi sono stati inviati all'Istituto Superiore di Sanità per la conferma dei dati ottenuti e la tipizzazione mediante sequenziamento genico.

Lo studio svolto nel triennio 2010-2012 ha portato alla raccolta di 185 campioni di liquame.

Nessun campione è risultato positivo per poliovirus selvaggio o vaccinale; sulle cellule L2ob, infatti, non è stato rilevato in nessun caso un effetto citopatico, e la Nested PCR ha confermato la negatività in tutti i campioni.

Per quanto riguarda l'isolamento sulle cellule RD nel triennio in studio ha individuato 147 campioni positivi sui 185 esaminati (79%) i quali erano così distribuiti (Tabella 10):

- ✓ Nosedo - 46 campioni positivi su 59 (78%), pari al 31% (46/147) del totale dei positivi;
- ✓ Nosedo ampliamento Est - 47 campioni positivi su 59 (80%), pari al 32% (47/147) del totale dei positivi;
- ✓ Peschiera Borromeo - 54 campioni positivi su 67 (81%), pari al 37% (54/147) del totale dei positivi.

COLLETTORE	CAMPIONI ANALIZZATI	CAMPIONI POSITIVI SU RD	CAMPIONI POSITIVI SU L2ob
Nosedo	59	46	0
Nosedo Ampliamento Est	59	47	0
Peschiera Borromeo	67	54	0
Totale	185	147	0

Tabella 10. Risultati dell'isolamento in coltura cellulare per ogni collettore esaminato nel triennio 2010-2012

Le tipizzazioni degli enterovirus effettuate dall'ISS sono disponibili solo per il 2010, in quanto gli altri esiti da parte dell'ISS sono ancora in corso.

La situazione analizzata anno per anno è riportata di seguito.

4.2.2 Risultati delle analisi sui campioni di liquame: anno 2010

Nel 2010 sono stati raccolti in totale 64 campioni di liquame, così distribuiti nei tre collettori:

- 21 da Nosedo ampliamento Est
- 21 da Nosedo
- 22 da Peschiera Borromeo

Della totalità dei campioni, l'89% (57/64) è risultato positivo per enterovirus non-polio in coltura cellulare (Figura 5). Nessun campione ambientale seminato nelle cellule L20b è risultato positivo per poliovirus selvaggio o vaccinale. Tutti i risultati sono stati confermati in Nested PCR.

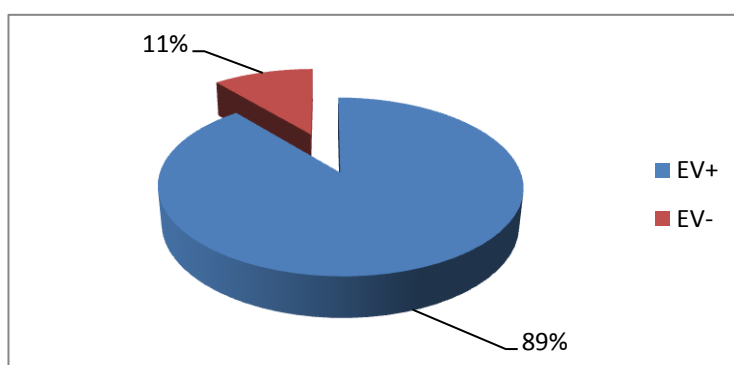


Figura 5. Prevalenza degli enterovirus non-polio isolati in coltura cellulare RD nel 2010

Per il collettore di Nosedo i campioni positivi per enterovirus non-polio isolati in coltura cellulare RD sono stati circa il 90% (19/21), mentre per il collettore di Nosedo Ampliamento Est il 90% (19/21). Dei liquami del depuratore di Peschiera Borromeo sono risultati positivi in coltura cellulare RD circa il 86% (19/22) (Figura 6).

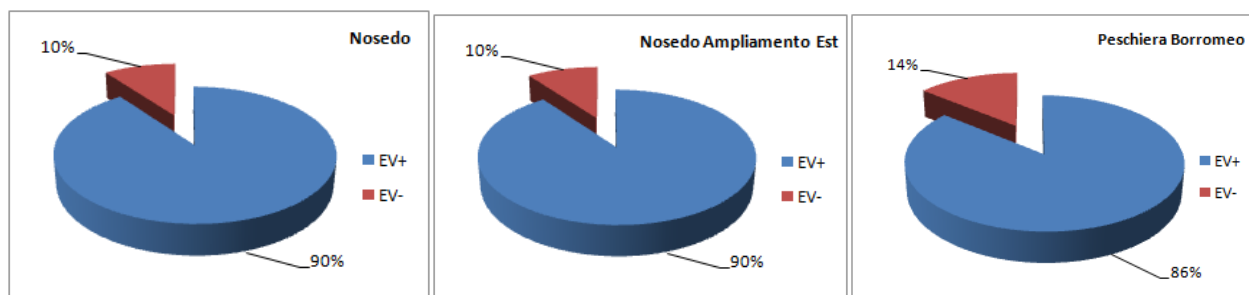


Figura 6. Prevalenza degli enterovirus non-polio isolati in coltura cellulare RD nei liquami dei tre collettori nel 2010

Dai risultati delle tipizzazioni, la maggior parte dei campioni (29/57, 45%) sono risultati coxsackie virus di tipo B (CVB), 16 isolati su 57 (25%) sono risultati echovirus, e 12 campioni (19%) risultano essere costituiti da enterovirus misti (Figura 7).

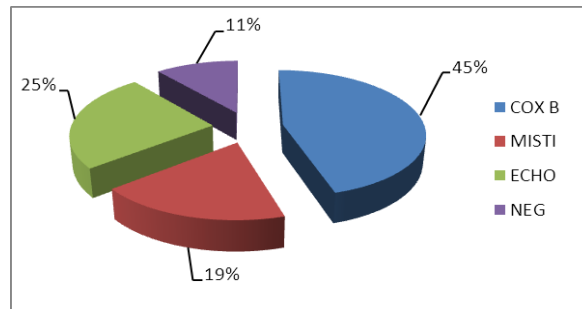


Figura 7. Enterovirus non-polio nei liquami del 2010

Tra i coxsackie virus sono stati ritrovati: 3 CVB2 (10%), 2 CVB3 (7%), 16 CVB4 (55%) e 8 CVB5 (28%), mentre degli echovirus sono stati trovati 3 Echo4 (19%), 6 Echo6 (38%), 1 Echo7 (6%), 5 Echo11 (31%) e 1 Echo25 (6%). I sierotipi misti sono risultati: 2 CVB4-Echo4 (17%), 2 CVB4-CVB5 (17%), 1 CVB5-Echo4 (8%), 2 CVB5-Echo6 (17%), 4 CVB5-Echo11 (33%), 1 CVB5-Echo30 (8%) (Figura 8).

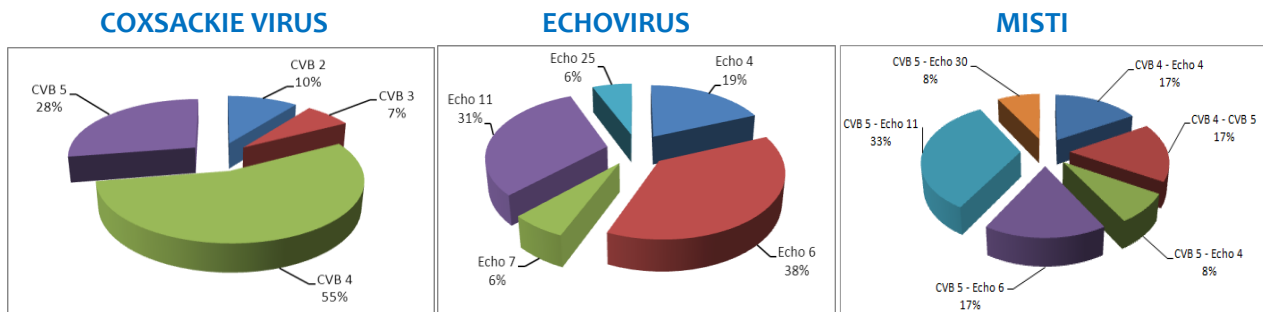


Figura 8. Sierotipi di coxsackie virus, echovirus e misti riscontrati nei liquami del 2010

In tabella 11 sono mostrati i risultati dell'andamento quindicinale della circolazione dei sierotipi di enterovirus non-polio caratterizzati, nei collettori di Nosedo Ampliamento Est, Nosedo e Peschiera Borromeo nel 2010.

NOSEDO EST			NOSEDO			PESCHIERA BORRAMEO		
Campione	Data prelievo	Sierotipo	Campione	Data prelievo	Sierotipo	Campione	Data prelievo	Sierotipo
1	12-gen	CVB 5 - Echo 30	1	12-gen	Echo 6	1	22-gen	CVB 5
2	19-feb	negativo	2	19-feb	Echo 6	2	5-feb	CVB 5
3	27-feb	CVB 4	3	27-feb	CVB 4	3	19-feb	CVB 5
4	19-mar	CVB 5	4	19-mar	CVB 4	4	10-mar	CVB 2
5	1-apr	negativo	5	1-apr	Echo 25	5	26-mar	CVB 5
6	13-apr	CVB 4	6	13-apr	CVB 2	6	14-apr	CVB 5
7	7-mag	CVB 4	7	9-mag	Echo 4	7	21-apr	CVB 4
8	20-mag	CVB 4	8	20-mag	CVB 4 - Echo 4	8	16-mag	CVB 4 - CVB 5
9	11-giu	CVB 4	9	11-giu	CVB 4	9	23-mag	CVB 4
10	2-lug	CVB 4	10	2-lug	CVB 4 - Echo 4	10	18-giu	negativo
11	23-lug	Echo 4	11	23-lug	Echo 6	11	25-giu	CVB 4 - CVB 5
12	6-ago	CVB 5 - Echo 6	12	6-ago	Echo 6	12	7-lug	Echo 6
13	20-ago	CVB 5	13	20-ago	negativo	13	26-lug	CVB 4
14	17-set	CVB 5	14	17-set	negativo	14	27-ago	Echo 7
15	1-ott	Echo 6	15	1-ott	Echo 4	15	8-set	Echo 11
16	14-ott	CVB 5 - Echo 11	16	14-ott	CVB 4	16	24-set	CVB 2
17	29-ott	CVB 4	17	29-ott	CVB 3	17	10-ago	negativo
18	3-nov	CVB 5 - Echo 6	18	3-nov	CVB 3	18	22-ott	negativo
19	13-nov	CVB 5 - Echo 4	19	13-nov	CVB 5 - Echo 11	19	10-nov	CVB 4
20	17-dic	CVB 5 - Echo 11	20	17-nov	Echo 11	20	25-nov	CVB 4
21	20-dic	Echo 11	21	20-dic	CVB 5 - Echo 11	21	2-dic	Echo 11
						22	17-dic	Echo 11

Tabella 11. Tipizzazione degli enterovirus non-polio del 2010

4.2.3 Risultati delle analisi sui campioni ambientali: anno 2011

Nel 2011 sono stati raccolti in totale 69 campioni di liquame, così distribuiti nei tre collettori:

- 24 da Nosedo ampliamento Est
- 24 da Nosedo
- 21 da Peschiera Borromeo

Della totalità dei campioni, l'85% (59/69) è risultato positivo per enterovirus non-polio in coltura cellulare, superando notevolmente il minimo di positività del 30% previsto dalle linee guida dell'OMS (Figura 9. *Prevalenza degli enterovirus non-polio isolati in coltura cellulare RD nel 2011*).

Nessun campione ambientale seminato nelle cellule L20b è risultato positivo per poliovirus selvaggio o vaccinale. Utilizzando la biologia molecolare (Nested PCR), più sensibile degli isolamenti colturali, i campioni di liquame positivi per enterovirus non-polio sono 67, il 97% del totale, e tutti sono stati confermati negativi per poliovirus.

Le caratterizzazioni degli enterovirus non-polio sono in corso presso l'Istituto Superiore di Sanità (ISS).

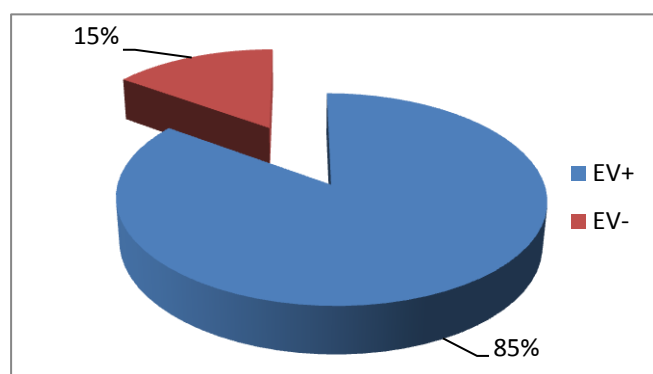


Figura 9. Prevalenza degli enterovirus non-polio isolati in coltura cellulare RD nel 2011

Per il collettore di Nosedo i campioni positivi per enterovirus non-polio isolati in coltura cellulare RD sono stati circa il 79% (19/24), mentre per il collettore di Nosedo Ampliamento Est l'83% (20/24). Dei liquami del depuratore di Peschiera Borromeo sono risultati positivi in coltura cellulare RD circa il 95% (20/21) (Figura 10).

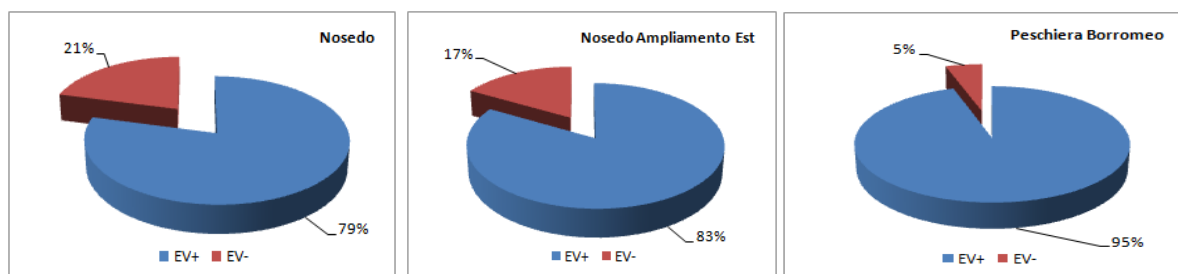


Figura 10. Prevalenza degli enterovirus non-polio isolati in coltura cellulare RD nei liquami dei tre collettori nel 2011

4.2.4 Risultati delle analisi sui campioni ambientali: anno 2012

Nel 2012 sono stati raccolti in totale 52 campioni di liquame, così distribuiti nei tre collettori:

- 14 da Nosedo ampliamento Est
- 14 da Nosedo
- 24 da Peschiera Borromeo

In seguito a problemi organizzativi con l'ARPA, il flusso dei campioni al nostro laboratorio si è interrotto. È stato comunque possibile in seguito recuperare i campioni conservati refrigerati dall'ARPA e analizzarli secondo la procedura standard, ma alcuni restano ancora da testare. Inoltre per i collettori di Nosedo e Nosedo ampliamento Est i campionamenti arrivano fino al mese di ottobre e risultano mancanti quelli del mese di febbraio e per il collettore di Peschiera Borromeo l'ultimo prelievo risale a metà novembre. Dei 52 campioni ricevuti, 10 (19%) sono ancora da testare. Per quanto riguarda i 42 campioni di liquame che sono stati analizzati in isolamento in cellule RD, 31 (74%) sono risultati positivi per enterovirus non-polio (Figura 11).

Nessun campione ambientale seminato nelle cellule L20b è risultato positivo per poliovirus selvaggio o vaccinale. Utilizzando la biologia molecolare (Nested PCR) i campioni di liquame positivi per enterovirus non-polio sono 36, l'86% del totale, e tutti sono stati confermati negativi per poliovirus. Le caratterizzazioni degli enterovirus non-polio sono in corso presso l'Istituto Superiore di Sanità (ISS).

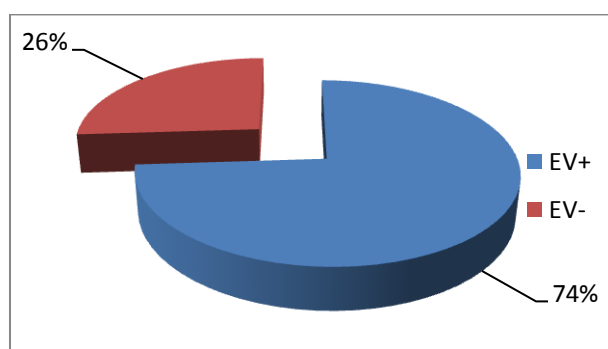


Figura 11. Prevalenza degli enterovirus non-polio isolati in coltura cellulare RD nel 2012

I campioni positivi per enterovirus non-polio rispetto a quelli analizzati mediante l'isolamento in cellule RD sono stati circa il 67% (8/12) per i collettori di Nosedo e Nosedo Ampliamento Est; dei liquami del depuratore di Peschiera Borromeo sono risultati positivi in coltura cellulare RD circa il 83% (15/18) (Figura 12).

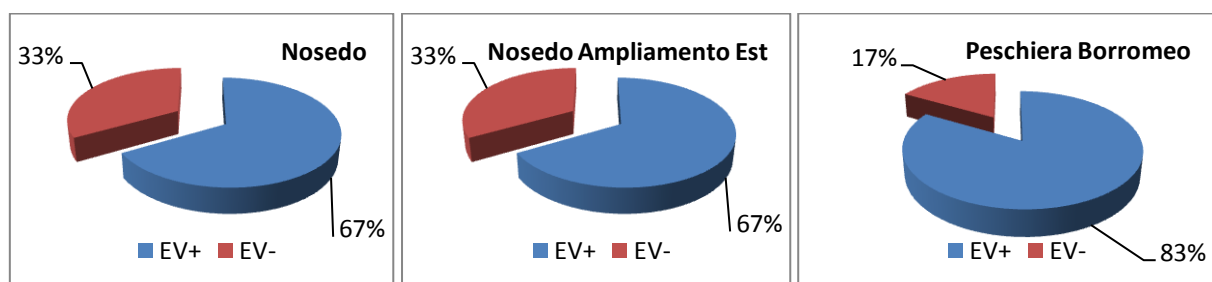


Figura 12. Prevalenza degli enterovirus non-polio in coltura cellulare RD nei liquami dei tre collettori nel 2012

5.DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

La poliomielite, detta spesso polio o paralisi infantile, è una malattia acuta virale altamente contagiosa causata da tutti i tre tipi di poliovirus esistenti e che colpisce principalmente i bambini. È stata per molto tempo endemica e ha causato ingenti epidemie in passato a partire dal XIX secolo in molti Paesi europei e del Nord America.

Oggi la sua diffusione si è notevolmente ridotta grazie soprattutto all'introduzione della vaccinazione nel 1955 con la somministrazione del vaccino orale di Sabin (OPV) e pochi anni dopo con l'ideazione da parte di Salk del vaccino a iniezione (IPV). L'eradicazione della poliomielite, cioè l'eliminazione non solo dei casi di malattia ma anche del virus dal mondo, è attualmente lo scopo da raggiungere.

Il programma di eradicazione è partito nel 1988, promosso dall'OMS, dall'Unicef, dal Rotary e dal CDC e rappresenta l'obiettivo più ambizioso della prevenzione. Il termine temporale di eradicazione era previsto per l'anno 2000 ed è stato poi rimandato all'anno 2005, e successivamente al 2010, ma ancora una volta la situazione epidemiologica non consentì il raggiungimento di questo obiettivo. Infine il Programma del piano strategico 2010-2012, prevedeva la fine della circolazione dei poliovirus selvaggi entro la fine del 2012, ma anche questo è fallito.

Nonostante il traguardo non sia stato ancora raggiunto, al 25 dicembre 2012 la polio è più strettamente circoscritta che mai, facendo registrare oltre al numero di casi più basso mai riportato, anche il numero inferiore di Paesi endemici e di altri Paesi coinvolti dalla circolazione di poliovirus selvaggi. Infatti nel 1988 si verificavano 350.000 casi in 125 Paesi endemici e nel 2012, al 25 dicembre, sono stati registrati solamente 215 casi e i Paesi endemici sono solo 3: Pakistan, Afganistan e Nigeria, essendo l'India stata dichiarata polio-free proprio quest'anno e solamente il Ciad risulta tra i Paesi non endemici in cui si è registrata la presenza di casi.

Da quando è stato avviato tale programma sono stati vaccinati contro la polio più di 2,5 miliardi di bambini di età inferiore ai 5 anni in tutto il mondo, permettendo a 5 milioni di persone di evitare la paralisi. Questo ha richiesto 20 milioni di volontari e un investimento di oltre 8,2 miliardi di dollari, necessari per l'attuazione di strategie vaccinali, quali la vaccinazione routinaria, i NIDs, le campagne di mopping-up e i programmi di sorveglianza.

Un contributo fondamentale è stato sicuramente fornito dal Rotary, impegnato nel raggiungimento di tale obiettivo con il programma Polio Plus partito nel 1985 ancora prima del progetto mondiale di eradicazione. Il Rotary è un'organizzazione mondiale di oltre 1,2 milioni di uomini e donne provenienti dal mondo degli affari, professionisti e leader comunitari. I soci dei Rotary club, noti come Rotariani, forniscono servizi umanitari, incoraggiano il rispetto di rigorosi principi etici nell'ambito professionale e contribuiscono a diffondere il messaggio di pace e buona volontà. Le principali responsabilità del Rotary sono la raccolta fondi e il sostegno della causa, un ruolo di crescente importanza con l'avvicinarsi del momento finale. All'inizio di settembre 2012 il Rotary ha lanciato un nuovo sito interattivo – www.endpolionow.org/it - che mira a educare, attivare e ispirare i visitatori a sostenere in modo attivo l'impegno dell'eradicazione della polio. I visitatori sono impegnati a firmare una petizione destinata ai leader mondiali perché impegnino ulteriori risorse per chiudere il divario dei fondi necessari. Il Rotary, che ha già contribuito con oltre 1,2 miliardi di dollari ha recentemente preso l'impegno di contribuire con

altri 75 milioni di dollari nel corso del prossimo triennio. All'inizio del 2012 ha raccolto 228 milioni di dollari di nuovi fondi per l'eradicazione della polio, in risposta alla sovvenzione-sfida di 335 milioni di dollari lanciata dalla Gates Foundation, che è tra i finanziatori della causa, che ha provveduto a contribuire altri 50 milioni di dollari come riconoscimento dell'impegno del Rotary.

Dal 2009 il Rotary celebra il suo anniversario proiettando simultaneamente il suo logo e quello di *End Polio Now* sui monumenti icona della più importanti città del mondo. Nel 2012, tra le altre città italiane ed internazionali che hanno preso parte a tale iniziativa c'è anche la città di Milano; sul Palazzo Senatorio è stato proiettato un mosaico di visi di migliaia di persone comuni che si è tradotto nel messaggio *chiunque può contribuire a tagliare il traguardo. Basta poco così*.

La campagna di eradicazione della polio ha inoltre portato diversi benefici nell'ambito della sanità pubblica, per l'assistenza sanitaria e le immunizzazioni, oltre che benefici economici. Ad esempio, insieme al vaccino anti-polio ai bambini è stata somministrata la vitamina A, che rafforza il sistema immunitario ed aiuta i bambini a lottare contro la diarrea, il morbillo e altre malattie infettive. Inoltre l'aumento delle consegne di vaccino anti-polio ha gettato le basi per le iniziative di immunizzazione di successo, come quella contro il morbillo; l'ingente infrastruttura per la polio, costruita nel corso degli anni, aiuta a sostenere le campagne di somministrazione di altri vaccini, raddoppiando il numero di bambini vaccinati in alcune aree meno sviluppate dell'Africa e del sud-est asiatico. Inoltre le reti locali per l'immunizzazione contro la polio possono essere mobilitate in caso di emergenza per disastri correlati alla salute. Veicoli, apparecchiature radio e uffici possono essere messi a servizio in caso di emergenza. Secondo uno studio pubblicato su *Vaccine* nel 2010, l'Iniziativa per l'Eradicazione Globale della Polio (GPEI) potrebbe tradursi in un beneficio economico per un valore tra 40 e 50 miliardi di dollari tra il 1988 e il 2035. In base al rapporto si prevedono da 17 miliardi a 90 miliardi di dollari in benefici derivanti dalla distribuzione di integratori alimentari di vitamina A.

La GPEI ha inoltre lanciato uno slogan convincente 'Every Last Child', catturando la visione per il successo e riassumendone il suo fine ultimo: se gli sforzi per raggiungere e vaccinare ogni bambino falliranno, questo determinerà il fallimento dell'intero progetto di eradicazione.

Da quando è iniziato il programma di eradicazione, grazie a quest'impegno collettivo sono stati conseguiti molti progressi per interrompere la trasmissione dei poliovirus selvaggi che ha fatto registrare una riduzione globale dell'incidenza della polio superiore al 99%, passando dai 1.000 casi registrati al giorno nel 1988 a meno di 1 caso al giorno nel 2012.

La poliomielite è stata per lungo tempo un importante problema di Sanità Pubblica, facendo registrare migliaia di casi nel mondo e oggi, in seguito all'impegno per l'eradicazione è ancora al centro dei programmi di Sanità pubblica.

Secondo l'Independent Monitoring Board (IMB), che si incarica di valutare i progressi compiuti verso il conseguimento di un mondo libero dalla polio "fermare la trasmissione della polio è un'emergenza sanitaria globale. Il mancato raggiungimento di questo obiettivo permetterà alla poliomielite di risorgere".

Come dichiarato dal Presidente del Rotary Wilf Wilkinson: "Siamo ormai a un punto cruciale tra successo e fallimento, laddove il conseguimento del successo non è mai stato così a portata di mano. Dobbiamo approfittare della situazione e agire immediatamente, per evitare il rischio di non mantenere la nostra promessa ai bambini del mondo".

Il programma sta vivendo un livello senza precedenti di priorità e di impegno, in gran parte derivante dalla dichiarazione nel 2012 da parte dell'Assemblea Mondiale della Sanità che "il completamento dell'eradicazione della polio è un'emergenza programmatica per la salute pubblica mondiale" (101).

La storia mostra però come la polio possa essere crudele in quanto può risorgere facilmente. Vi è un rischio significativo di avere casi più polio nel 2013 che nel 2012, e in più Paesi. Il programma deve pertanto ricevere un livello di priorità non solo per il controllo di tale rischio, ma per ottenere un altro anno di importanti progressi verso l'arresto della trasmissione (102).

Infatti, l'importazione di poliovirus selvaggio in territori indenni è sempre possibile finché non si sarà giunti all'eradicazione globale della poliomielite.

È pertanto possibile eradicare la poliomielite solo a patto che vengano applicate correttamente ed efficacemente le strategie raccomandate, cioè l'attuazione della vaccinazione routinaria e le attività di immunizzazione supplementari e di sorveglianza.

È importante sottolineare che quando è partito il programma, l'eradicazione della polio prevedeva "l'eradicazione di tutti i poliovirus selvaggi" e veniva specificato che "il verificarsi di casi clinici di poliomielite causati da altri enterovirus, inclusi i poliovirus vaccinali attenuati, non invalidano il raggiungimento dell'eradicazione dei poliovirus selvaggi" (103). Successivamente, in seguito soprattutto al focolaio di casi di paralisi da poliovirus vaccinale registrato nell'isola Hispaniola, la Global Commission for the Certification of the Eradication of Poliomyelitis (GCC) ha riconosciuto che la completa eradicazione sarà realizzata solo in assenza di circolazione dei poliovirus vaccinali (VDPV) e ha richiesto all'OMS di sviluppare un progetto separato per verificare l'assenza di circolazione di VDPV dopo l'eradicazione della polio e in particolar modo dopo l'interruzione dell'utilizzo del vaccino orale.

Infatti, l'eradicazione definitiva di tutti i poliovirus virulenti non potrà essere assicurata fino a quando si continuerà ad usare l'OPV, in quanto i poliovirus derivanti da questo vaccino, circolando a lungo nelle popolazioni e in particolare in quelle con protezione immunitaria distribuita a macchia di leopardo, possono riacquisire caratteristiche proprie dei ceppi selvaggi, quali un'elevata trasmissibilità da persona, un significativo tasso di attacco paralitico e proprietà antigeniche non "vaccine-like", causando epidemie di notevole rilevanza.

La somministrazione dell'OPV dovrà quindi essere interrotta subito dopo la certificazione della scomparsa dei poliovirus selvaggi, per passare all'IPV. L'OMS ha stabilito che dopo l'eradicazione globale della poliomielite si dovrà dapprima ottenere la "Certificazione dell'eradicazione del poliovirus selvaggio", poi verificare l'assenza di circolazione di poliovirus vaccino-derivato trascorsi 3 anni dal cessato utilizzo di OPV. Soltanto dopo 20 anni potrà essere interrotta anche l'immunizzazione mediante IPV. Quindi tutte le strategie di controllo pre-eradicazione dovranno essere mantenute per un lungo periodo successivo all'eradicazione.

Un altro aspetto importante da considerare per poter certificare l'eliminazione dei poliovirus è il contenimento dei poliovirus selvaggi nei laboratorio le cui indicazioni sono riportate nel "piano d'azione globale per il contenimento di laboratorio dei poliovirus selvaggi" redatto dall'OMS che riguardano sia la fase pre- che quella post-eradicazione (104).

La fase post-eradicazione mondiale comincia un anno dopo il rilevamento dell'ultimo poliovirus selvaggio nel mondo, quando si presume che sia cessata ogni trasmissione umana. Secondo tale documento, questa fase prevede un *elevato contenimento dei materiali infettivi o potenzialmente infettivi per poliovirus selvaggi (BSL-3/polio)*. Infatti tutti i laboratori in possesso di materiale infettivo o potenzialmente infettivo devono adottare una o più delle seguenti opzioni:

1. mettere in opera le procedure di contenimento (BSL-3/polio), oppure
2. trasferire i materiali infettivi o potenzialmente infettivi per poliovirus selvaggi in appositi depositi designati dall'Organizzazione Mondiale della Sanità, oppure

3. rendere non più infettanti i materiali infettivi o potenzialmente infettivi per poliovirus selvaggi, ovvero distruggerli, seguendo procedure adeguate.

Tutte le azioni di biosicurezza devono essere messe in opera e ne deve essere documentata la completezza prima che possa essere attuata la certificazione di eradicazione globale della polio. Inoltre per la fase post-immunizzazione con OPV è previsto un *massimo contenimento (BSL-4) dei materiali infettivi o potenzialmente infettivi per poliovirus selvaggi ed alto contenimento (BSL-3/polio) dell'OPV e dei virus OPV-derivati.*

Questa fase inizia con la cessazione mondiale dell'immunizzazione con OPV e con il conseguente rapido aumento del numero di bambini suscettibili all'infezione. I requisiti di biosicurezza per i materiali infettivi o potenzialmente infettivi per poliovirus selvaggi aumentano da BSL-3/polio a BSL-4, mentre i requisiti per OPV e virus derivati dall'OPV aumentano da BSL-2/polio a BSL-3/polio per prevenire la reintroduzione e la potenziale circolazione di questi virus nella popolazione non più immunizzata. Devono essere sviluppate procedure per controllare o distruggere OPV non utilizzati sulle cliniche, nei centri di immunizzazione, negli ambulatori medici, ed in altri siti.

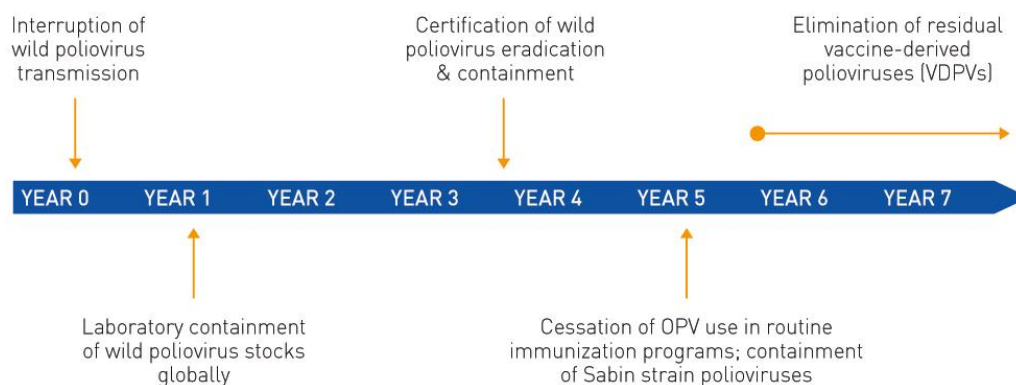


Figura 1. Sequenza temporale della fase post-eradicazione (105)

Sono diversi i problemi ancora esistenti e che rendono problematica l'eradicazione dell'ultimo 0,1% dei casi di polio e quindi la continua circolazione di poliovirus selvaggi nei Paesi endemici e l'importazione del virus in aree polio-free. Il principale problema è rappresentato da un'insufficiente copertura vaccinale che non viene raggiunta per diversi motivi, quali l'insicurezza e l'insufficiente investimento politico e sociale e problemi religiosi. Ad esempio, di recente in Pakistan alcuni operatori sanitari sono stati uccisi da coloro che si oppongono alla campagna sanitaria perché la scambiano come un'ingerenza dell'Occidente e dei suoi servizi segreti sul loro territorio. Inoltre alcune delle principali epidemie che hanno colpito Europa e USA in passato sono quelle che hanno interessato le comunità Amish in Olanda e Nord America a causa del loro rifiuto di sottoporsi alla vaccinazione. Un altro aspetto critico sono i conflitti attivi in alcuni territori, come ad esempio in Afghanistan, che rendono difficoltoso e a volte impossibile il raggiungimento delle comunità da vaccinare.

Le recenti epidemie come quella del Tajikistan del 2010 sottolineano invece proprio la necessità di mantenere un'elevata copertura vaccinale tramite la vaccinazione per prevenire le epidemie e una sorveglianza di ottima qualità per identificare rapidamente e rispondere tempestivamente all'eventuale presenza di casi. E' inoltre di fondamentale importanza il ricorso alle attività di vaccinazione

supplementare in caso di circolazione di poliovirus selvaggio. Particolarmente rilevante per tale scopo è l'introduzione di nuovi vaccini, quelli monovalenti e bivalenti, più efficaci dei trivalenti in uso.

È anche fondamentale investire in una buona sorveglianza, sia clinica che ambientale, per consentire una costante vigilanza, anche in Paesi polio-free dove è sempre possibile la reintroduzione di poliovirus.

Nell'ambito del progetto di eradicazione mondiale della poliomielite, la sorveglianza delle Paralisi Flaccide Acute (PFA) rimane tra le principali strategie messe in atto per il controllo della circolazione dei poliovirus. Infatti solo indagando questi casi, caratterizzati da un quadro clinico sovrapponibile alla polio, ed effettuando gli accertamenti di laboratorio che consentono di verificare se sono causati da poliovirus, si può raggiungere l'obiettivo di tenere sotto controllo la malattia e quindi eradicarla.

La sorveglianza ambientale, introdotta successivamente come supporto alla sorveglianza clinica, è importante perché può rilevare casi di infezione da poliovirus selvaggio o vaccinale anche in assenza di paralisi e permette di controllare un elevato numero di persone contemporaneamente. Oltre alla ricerca dei poliovirus viene anche effettuata quella degli enterovirus non-polio a causa della loro possibile ricombinazione con i poliovirus da cui potrebbero derivare dei ceppi con un'elevata virulenza.

Il laboratorio presso il quale ho svolto la mia attività di Dottorato è il Centro di Riferimento Regionale della Lombardia e si occupa dell'attività di sorveglianza delle PFA e di quella ambientale.

La sorveglianza attiva della PFA esiste in Lombardia dal 1997. Dopo l'introduzione di alcune modifiche nel corso degli anni, la rete che opera attualmente nella nostra regione è complessivamente soddisfacente. Le 51 strutture includono gli ospedali più grandi e specializzati, dove è più probabile che afferiscano i casi di interesse. Inoltre la loro distribuzione geografica, che copre tutte le dodici province lombarde, dimostra la possibilità di controllare adeguatamente l'intero territorio lombardo.

Purtroppo però i referenti ospedalieri non sono molto attenti nella segnalazione dei casi determinando la sottotifica dei casi e anche una non ottimale segnalazione degli "zero casi".

Nell'attività svolta nel triennio 2010-2012 nell'ambito della sorveglianza delle PFA in Lombardia sono stati indagati 27 casi di paralisi flaccida acuta, di cui nessuno è risultato causato da poliovirus selvaggio. Per tutti i casi è stato possibile analizzare due campioni di feci, tranne per un caso in cui ne è stato esaminato comunque uno; tuttavia solo nel 2011 è stata raggiunta la percentuale dell'80% dei casi - come previsto dall'OMS - in cui i campioni sono stati raccolti entro 14 giorni dall'esordio della paralisi. Nel 2010 e nel 2012, in cui sono stati registrati la maggior parte dei casi, è stata ottenuta la percentuale di positività per enterovirus rispettivamente del 25% e del 18%, raggiungendo quella prevista del 10%, e sono stati rilevati anche degli adenovirus, due nel 2010 e uno nel 2012. I casi di paralisi risultano per lo più sindromi di Guillain-Barré, in accordo ai dati nazionali, anche se nel 2012 si osserva una notevole riduzione di queste diagnosi, sia tra i casi notificati, sia tra quelli rilevati dalle SDO.

In nessuno dei tre anni oggetto dello studio è stato raggiunto l'obiettivo dei 14 casi attesi e anche gli altri indicatori di performance risultano scarsi dimostrando che i casi notificati spesso non vengono prontamente e adeguatamente segnalati.

I dati risultano paragonabili a quelli del resto dell'Italia, infatti, secondo i dati del Ministero della Salute, fino al 2011 in Italia solo nel 2003 è stato ottenuto il numero dei casi atteso e raramente sono stati raggiunti gli obiettivi previsti riguardanti gli indicatori di performance.

Gli Ospedali della rete lombarda sono stati richiamati durante i tre anni per migliorare la loro attività e per tale scopo è risultato utile l'utilizzo delle SDO, grazie alle quali sono stati recuperati i casi persi per sollecitare gli ospedali ad una più attenta partecipazione. In particolare forse il richiamo nel 2012 è stato quello maggiormente significativo, che ha portato all'aumento delle adesioni e a un miglioramento nelle segnalazioni, almeno rispetto all'anno precedente.

Per quanto riguarda la sorveglianza ambientale, attiva in Lombardia dal 2005, l'attività è stata inizialmente piuttosto regolare, ma ha visto un'interruzione nel 2012.

Durante i tre anni oggetto dello studio non è mai stata rilevata la presenza di poliovirus selvaggi o vaccinali, così come nel resto dell'Italia; questo è reso possibile dall'elevata copertura vaccinale presente nel nostro Paese e dall'interruzione dell'utilizzo del vaccino orale. Il ritrovamento di enterovirus non-polio nei liquami con una prevalenza sempre superiore al limite imposto dall'OMS del 30% conferma la buona qualità delle indagini svolte. In particolare l'elevata percentuale, registrata del 79%, di campioni di liquame positivi sottolinea un'elevata circolazione di enterovirus non-polio nella popolazione lombarda.

Del 2010 sono anche disponibili i risultati delle tipizzazioni svolte dall'ISS, che evidenziano soprattutto un'elevata circolazione di coxsackie virus B e una notevole circolazione anche di echovirus. I dati sono compatibili con quelli del resto dell'Italia, almeno per quello che riguarda il 2010 per il quale i dati sono disponibili. Il ritrovamento di un sierotipo di enterovirus nei liquami comunque indica una maggior circolazione di quel sierotipo in quel determinato periodo, ma non esclude la presenza di altri sierotipi circolanti.

Nel 2012 l'interruzione della consegna dei liquami al laboratorio non ha permesso di indagare tempestivamente i campioni di liquame. Ci si auspica che l'attività riprenda regolarmente, perché la sorveglianza ambientale, insieme a quella delle PFA, dovranno continuare anche dopo il raggiungimento dell'eradicazione della poliomielite, in quanto solo sorvegliando la popolazione si potrà valutare la reale scomparsa del virus e della malattia.

6. APPENDICE

- "Scheda di adesione alla rete di sorveglianza delle paralisi flaccida acuta"
- Modulo di "riepilogo quindicinale dei casi di paralisi flaccida acuta"
- Modulo di "Segnalazione iniziale"
- Modulo "Conferma prelievi"
- Modulo "Follow up a 60 giorni"

Carta intestata della Struttura

**SCHEDA DI ADESIONE ALLA RETE DI SORVEGLIANZA
DELLA PARALISI FLACCIDA ACUTA (PFA)**

Con la presente si conferma l'adesione della propria Struttura alla rete di sorveglianza della paralisi flaccida acuta in collaborazione con il laboratorio di Diagnostica Virologica del Dipartimento di Scienze Biomediche per la Salute di via C. Pascal, dell'Università degli Studi di Milano.

Tipo di Struttura : _____

Nome della Struttura : _____

Cognome e nome del Referente : _____

Telefono : _____

Fax : _____

e-mail : _____

Si dichiara di aver preso visione di quanto riportato in allegato relativamente alle modalità di conduzione della sorveglianza.

Data _____

Firma del Referente _____

Carta intestata della struttura

RIEPILOGO QUINDICINALE DEI CASI DI PARALISI FLACCIDA ACUTA

REPORT del MESE di _____

dal 1 al 15

dal 16 alla fine del mese

NESSUN CASO SEGNALATO

N°.....CASI SEGNALATI

IL REFERENTE DI STRUTTRA dr. _____

firma _____

Data ___/___/___

Sorveglianza AFP



Segnalazione iniziale

Regione _____ Provincia _____ ASL _____
Cognome e nome _____ Sesso _____
Luogo di nascita _____ Data ___/___/___
Domicilio _____
Tel _____
Residenza (se diversa dal domicilio) _____
Affetto da _____ dal ___/___/___
Ricoverato presso _____ dal ___/___/___
Reparto _____ Indirizzo _____

febbre all'inizio della paralisi: si no non noto
progressione della paralisi entro 4 giorni dall'inizio dei sintomi: si no non noto
asimmetria della paralisi: si no non noto
localizzazione paralisi: arti arti e musc. respiratori bulbare facciale non noto
Vaccinazione antipolio (indicare data e tipo di vaccino per ciascuna dose) si no non noto

I dose ___/___/___ II dose ___/___/___ III dose ___/___/___ IV dose ___/___/___
IPV OPV IPV OPV IPV OPV IPV

Nel più breve tempo possibile vanno inviati al laboratorio di riferimento:

- **Due campioni di feci (prelevati ad un intervallo minimo di 24 ore e massimo 48 uno dall'altro)**
data I prelievo di feci ___/___/___ data II prelievo di feci ___/___/___
- **Due campioni di siero (prelevati ad un intervallo di 15 giorni)**

Si ricorda che 60 giorni dopo la comparsa dei sintomi andrà compilata la scheda di follow-up

Medico responsabile della notifica _____

Tel _____ fax _____ E-mail _____

La presente scheda va inviata via fax contemporaneamente a:

Ministero della Salute
Dip. della Prevenzione
Ufficio V - Malattie Infettive
Via G. Ribotta, 5
00144 Roma
Tel 06 59943856
Fax 06 59943096

Ist. Sup. di Sanità
C.R.I.V.I.B.
Viale Regina Elena, 299
00161 Roma
Tel 06 49903237
Fax 06 49902082

Università degli Studi di Milano
Dip. Scienze Biomediche per la Salute
Via C. Pascal, 36
20133 Milano
virolab@unimi.it
Tel. 02 50315125
Fax 02 50315120

Data ____/____/____

Sorveglianza AFP



CONFERMA DEI PRELIEVI

Regione _____ Provincia _____ ASL _____

Cognome e nome _____ Sesso _____

Luogo di nascita _____ Data ____/____/____

Date di raccolta dei campioni:

I campione di feci ____/____/____

II campione di feci ____/____/____

I campione di siero ____/____/____

Si ricorda che 60 giorni dopo la comparsa dei sintomi andrà compilata la scheda di follow-up

Medico responsabile della notifica _____

La presente scheda va inviata via fax contemporaneamente a:

Ministero della Salute
Dip. della Prevenzione
Ufficio V - Malattie Infettive
Via G. Ribotta, 5
00144 Roma
Tel 06 59943856
Fax 06 59943096

Ist. Sup. di Sanità
C.R.I.V.I.B.
Viale Regina Elena, 299
00161 Roma
Tel 06 49903237
Fax 06 49902082

Università degli Studi di Milano
Dip. Scienze Biomed. per la Salute
Via C. Pascal, 36
20133 Milano
virolab@unimi.it
Tel. 02 50315125
Fax 02 50315120

Data ____/____/____

Sorveglianza AFP



Follow-up a 60 giorni

Regione _____ Provincia _____ ASL _____

Cognome e nome _____ Sesso _____

Luogo di nascita _____ Data ____/____/____

Paralisi presente dopo 60 giorni

no si

Sito eventuale paralisi

gamba sinistra

gamba destra

braccio destro

braccio sinistro

musc. respiratori

nervi cranici

altro (specificare) _____

Miglioramento della paresi/paralisi rispetto alla fase acuta: no si

Commenti sull'eventuale grado di miglioramento _____

Allegare, se disponibili, il rapporto neurologico e/o referti strumentali

Diagnosi finale

poliomielite

sindrome di Guillain-Barrè

poliradiculoneurite/Sindrome di Landry

mielite trasversa

neuropatia traumatica

meningite

encefalite

compressione spinale specificare _____

(da neoplasia, ascesso, ematoma)

malattie sistemiche o metaboliche specificare _____

altro specificare _____

Medico responsabile _____

Data del follow-up _____

La presente scheda va inviata via fax contemporaneamente a:

Ministero della Salute
Dip. della Prevenzione
Ufficio V - Malattie Infettive
Via G. Ribotta, 5
00144 Roma
Tel 06 59943856
Fax 06 59943096

Ist. Sup. di Sanità
C.R.I.V.I.B.
Viale Regina Elena, 299
00161 Roma
Tel 06 49903237
Fax 06 49902082

Università degli Studi di Milano
Dip. Scienze Biomediche per la Salute
Via C. Pascal, 36
20133 Milano
virolab@unimi.it
Tel. 02 50315125
Fax 02 50315120

7. BIBLIOGRAFIA

1. World Health Assembly, *Global eradication of poliomyelitis by the year 2000: resolution of the 41st World Health Assembly. Resolution WHA 41.28. WHO: Geneva, Switzerland, 1988.*
2. *Sixty-Fifth World Health Assembly. Poliomyelitis: intensification of the global eradication initiative. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2012.*
3. www.polioeradication.org.
4. *Report of the Independent Monitoring Board of the Global Polio Eradication Initiative, November 2012.*
5. Greco D. *Eliminazione della poliomielite dal mondo. Ann Ig 2002; 14; n.4 (Suppl. 5): 59-64.*
6. *World Health Organization, Guidelines for environmental surveillance of poliovirus circulation, Vaccine and Biologicals, March 2003, WHO/V&B/03.03.*
7. Pallansch M.A., Roos R.P., *Enteroviruses: Polioviruses, Coxsackieviruses, Echoviruses and Newer Enteroviruses, 2001.*
8. Moroni M., Esposito R., De Lalla F., *Malattie infettive, V ed., 2001.*
9. Khetsuriani N, Lamonte-Fowlkes A, Oberst S, Pallansch MA. *Enterovirus surveillance--United States, 1970-2005. MMWR Surveill Summ. Sep 15 2006;55(8):1-20.*
10. Gallie D.R., *The cap and poly(A) tail function synergistically to regulate mRNA translational efficiency, Genes & development 1991; 5: 2108-2116 .*
11. Racaniello V. R., *Picornaviridae: The Viruses and Their Replication, 2001.*
12. Mims, Playfair, Roitt, Wakelin, Williams, *Medical Microbiology, Mosby, II ed., 1998.*
13. Fricks C.E., Hogle J.M., *Cell-induced conformational change in poliovirus: Externalization of the amino Terminus of VP1 is responsible for liposome binding, J Virol 1990; 64: 1934-1945.*
14. Ambros V., Baltimore D., *Purification and properties of a HeLa cell enzyme able to remove the 5'-terminal protein from poliovirus RNA, J Biol Chem 1980; 255: 6739-6744.*
15. Rubinstein M., Novick D., Cohen B., Barak S., Kim H. S., Barkan D., Levy Y., *The Structure of Cytokine Receptors and their Signalling, 2001.*
16. Mendelsohn C.D., Wimmer P., Racaniello V.R., *Cellular receptor for poliovirus: Molecular cloning, nucleotide sequence, and expression of a new member of immunoglobulin superfamily, Cell 1989, 56: 855-865.*
17. www.hprd.org.
18. Nomoto A., Koike S., Aoki J., *Tissue tropism and species specificity of poliovirus infection, Trends Microbiol 1994; 2: 47-51.*

19. McLaren L.C., Holland J.J., Syverton J.T., *The mammalian cell-virus relationship. Attachment of poliovirus to cultivated cells of primate and non-primate origin, J Exp Med* 1959, 109: 475-485.
20. Zhang S., Racaniello V.R., *Expression of PVR in intestinal epithelial cells is not sufficient to permit poliovirus replication in the mouse gut, J Virol* 1997; 71: 4915-4920.
21. Deatly A.M., Taffs R.E., McAuliffe J. M. et al., *characterization of mouse lines transgenic with the human poliovirus receptor gene, Microb Pathog* 1998; 25: 43-54.
22. Gromeier M., Bossert B., Arita M. et al., *Dual stem loops within the poliovirus internal ribosomal entry site control neurovirulence, J Virol* 1999; 73:958-964.
23. Rose JK, Trachsel H, Leong K, Baltimore D. *Inhibition of translation by poliovirus: inactivation of a specific initiation factor. Proc Natl Acad Sci USA* 1978; 75: 2732-2736. .
24. Clark M.E., Lieberman P.M., Berk A.J., Dasgupta A. *Direct cleavage of human TATA-Binding protein by poliovirus protease 3C in vivo and in vitro. Mol Cell Biol* 1993; 13:1232-1237.
25. Rubinstein S.J., Hammerle T., Wimmer E., Dasgupta A. *Infection of HeLa cells with poliovirus results in modification of a complex that binds to the rRNA promoter. J Virol* 1992; 66:3062-3068.
26. Guskey L.E., Smith P.C., Wolff D.A. *Patterns of cytopathology and lysosomal enzyme release in poliovirus-infected HEp-2 cells treated with either two-(alpha-hidroxybenzyl)-benzimidazole or guanidine HCl. J Gen Virol* 1970; 6:151-161.
27. Tolskaya E.A., Romanova L.I., Kolesnikova M.S., et al. *Apoptosis-inducing and apoptosis-preventing functions of poliovirus. 1995; 69:1181-1189.*
28. Yang W.X., Terasaki T., Shiroki K., et al.: *Efficient delivery of circulating poliovirus to the central nervous system independently of poliovirus receptor, Virology* 1997; 229: 421-428.
29. Nathanson N., Bodian D., *Experimental poliomyelitis following intramuscular virus infection. II, Viremia and the effect of antibody, Bull Johns Hopkins Hosp* 1961; 108:320-333.
30. Nathanson N., Langmuir A., *The cutter incident. Poliomyelitis following formaldehyde-inactivated poliovirus vaccination in the United States during the Spring of 1955. III. Comparision of the clinical character of vaccinated and contact cases occuring aft.*
31. Stebel P., Ion-Nedelcu N., Baughman A., et al., *Intramuscular injection within 30 days of immunization with oral poliovirus vaccine-A risk factor for vaccine-associated paralytic poliomyelitis, N Engl J Med* 1995; 332:500-506.
32. Atkinson W, Hamborsky J, McIntyre L, Wolfe S (eds.), *Poliomyelitis in Epidemiology and Prevention of Vaccine-Preventable Diseases (The Pink Book), 11th, Washington DC, Public Health Foundation, 2009, 231–44.*].
33. Leon-Monzon M.E., Dalakas M.C., *Detection of poliovirus antibodies and poliovirus genome in patients with the post-polio syndrome, Ann N Y Acad Sci* 1995; 753: 208-218].

34. Prevots DR, Ciofi degli Atti ML, Sallabanda A, et al. Outbreak of paralytic poliomyelitis in Albania, 1996: high attack rate among adults and apparent interruption of transmission following nationwide mass vaccination: *Clin Infect Dis* 1998; 26: 419-425.
35. Keja K., Chan C., Hayden G., Henderson R.H., Expanded programme on immunization, *World Health Stat Q* 1988; 41 (Suppl.2): 59-43.
36. Trask J.D., Vignec A.J., Paul J.R., Poliomyelitis virus in human stools, *JAMA* 1938; 111: 6-11.
37. Hovi T., Cantell K. et al., Outbreak of paralytic poliomyelitis in Finland: widespread circulation of antigenically altered poliovirus type 3 in a vaccinated population, *Lancet* 1986; 1: 1427-1434.
38. www.wikipedia.org.
39. Wyatt H.V., Poliomyelitis in the fetus and the newborn. A comment on the new understanding of the pathogenesis, *Clin Pediatr (Phila)* 1979; 18:33-38].
40. www.salute.gov.it.
41. Cohen JI, Chapter 175: Enteroviruses and Reoviruses in Kasper DL, Braunwald E, Fauci AS, et al., *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 16th, McGraw-Hill Professional, 2004, pp. 1144.
42. "World Development Report", Poliomyelitis, World Health Organization, Geneve. 1955. e: Investing in health. *World Development Indicators*, Oxford University Press, New York, 1993.
43. Barouk M. Assael, *Il favoloso innesto storia sociale della vaccinazione*, Bari, Editori Laterza, 1995.
44. Antonio Semprini. *Storia della poliomielite e della sua profilassi*.
45. Ryan KJ, Ray CG (eds.), *Enteroviruses in Sherris Medical Microbiology*, 4th, McGraw Hill, 2004, 535–7. ISBN 0-8385-8529-9.
46. Ohri, Linda K., Jonathan G. Marquess (1999). Polio: Will We Soon Vanquish an Old Enemy?. *Drug Benefit Trends* 11 (6): 41–54. URL consultato in data 23 agosto 2008.
47. www.epicentro.iss.it.
48. Rotbart H.A., "Enteroviral infections of the central nervous system", *Clin Infect Dis* 1995; 20: 971-981.
49. Bonanni P., Francesconi P., Santini M.G., *Epidemiologia e prevenzione delle malattie infettive*, 2002.
50. Leparc-Goffart I., Julien J., Fuchs F. et al., Evidence of presence of poliovirus genome sequences in cerebro-spinal fluid from patients with postpolio syndrome, *J Clin Microbiol* 1996; 34: 2023-2026.
51. Muir P., Nicholson F., Sharief M.K. et al., Evidence for persistent enterovirus infection of the central nervous system in patients with previous paralytic poliomyelitis, *Ann N Y Acad Sci* 1995; 753: 219-232.
52. Pezeshkpour G.H., dalakas M.C., pathology of spinal cord in postpoliomyelitis muscular atrophy, *Birth Defects* 1987; 23: 229-236.

53. Sharief M.K., Hentges R., Ciardi M., *Intrathecal immune response in patients with the post-polio syndrome*, *N Engl J Med* 1991; 325: 749-55.
54. Jubelt B., Salazar-Grueso E.F., Roos R.p., Cashman N.R., *Antibody titer to the poliovirus in blood and cerebrospinal fluid of patients with post-polio syndrome*, *Ann N Y Acad Sci* 1995; 753: 201-207.
55. Melchers W., De Visser M., Jongen P. et al., *The postpolio syndrome: No evidence for poliovirus persistence*, *Ann neurol* 1992; 32: 728-732.
56. Horstmann D.M., *Poliomyelitis: severity and type of disease in different age groups*, *Ann N Y Acad Sci* 1955; 61: 956-967.
57. Jubelt B., Narayan O., Johnson R.T., *Pathogenesis of human poliovirus infection in mice. II. Age-dependency of paralysis*, *J Neuropathol Exp neurol* 1980; 39: 149-159.
58. www.cdc.gov.
59. Sutter RW, John TJ, Jain H, et al. *Immunogenicity of bivalent types 1 and 3 oral poliovirus vaccine: a randomised, doubleblind.*
60. [Kew OM, Sutter RW, de Gourville EM, Dowdle WR, Pallansch MA. *Vaccine-derived polioviruses and the endgame strategy for global polio eradication. Annu Rev Microbiol.* 2005;59:587–635. DOI:10.1146/annurev.micro.58.030603.123625].
61. [Sutter RW, Prevots DR. *Vaccine-associated paralytic poliomyelitis among immunodeficient persons. Infect Med* 1994;11:426, 429–30, 435–8].
62. [Do"mo"k I. *Experiences associated with the use of live polio virus vaccine in Hungary, 1959–1982. Rev Infect Dis.* 1984;6(suppl 2):S413–S418; Terry LL. *The Association of Cases of Poliomyelitis With the Use of Type III Oral Poliomyelitis Vaccines. Washing.*
63. [Henderson DA, Witte JJ, Morris L, Langmuir AD. *Paralytic disease associated with oral polio vaccines. JAMA* 1964;190:41–8].
64. [Crovari P.: "Poliomielite: pensare a nuove strategie alla soglia dell'eradicazione? La risposta", *Vaccinazione* 2000, n. 41, 10-11, 1996].
65. [MMWR: *Poliomyelitis Prevention in the United States Updated Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). Recommendations and Reports May 19, 2000 – 49*].
66. R.K. Zimmerman, J. Spann. *Poliovirus vaccine options.* 1999 Jan 1;59(1):113-118.
67. Anil Dutta. *Epidemiology of poliomyelitis – Options and update.* *Vaccine* 2008.26;5767-5773.
68. [Jenkins HE et al. *Implications of a Circulating Vaccine-Derived Poliovirus in Nigeria. NEJM* 2010;362:2360-9].
69. *Network Italiano dei servizi di Vaccinazione – Poliomielite.*

70. CDC. *Travelers' health*. Atlanta, GA: US Dept of Health and Human Services, CDC. Available at <http://wwwnc.cdc.gov/travel>. Accessed March 14, 2011.
71. World Health Organization. *International travel and health 2010*. Geneva, Switzerland: World Health Organization Press; 2010. Available at <http://www.who.int/ith/chapters/en/index.html>. Accessed March 14, 2011.
72. World Health Assembly. *Global eradication of poliomyelitis by the year 2000: resolution of the 41st World Health Assembly*. Resolution WHA 41.28. WHO: Geneva, 1988.
73. **Minal K. Patel, Mandy Kader Konde, Boris Hermann Didi-Ngossaki, Edouard Ndinga, Riziki Yogolelo, Mbaye Salla, Keith Shaba, Johannes Everts, Gregory L. Armstrong, Danni Daniels, Cara Burns, Steve Wassilak, Mark Pallansch and Katrina Kretsinger.** *An Outbreak of Wild Poliovirus in the Republic of Congo, 2010–2011 Clinical Infectious Diseases* 2012;55(10):1291–8.
74. Global Polio Organization Initiative. *Program of Work 2009 and financial resource requirements 2009–2013, as of May 2009*. WHO, Rotary International, CDC, Unicef. Available from: http://www.polioeradication.org/content/general/Final_English.GPEIProgramofwork20.
75. Patti AM, Santi AL, Vulcano A, Casagni L, Lamberti A, De Stefano Caraffa D, Vellucci L, Fiore L, Fara GM. *Surveillance of poliomyelitis in Italy: immunity status of population against polio and environmental circulation of Poliovirus*. General illustration.
76. www.who.int.
77. *The Global Polio Eradication Strategic Plan, 2010–2012 WHO/Polio/10.01*.
78. *Morbidity and Mortality Weekly Report (CDC) Weekly / Vol. 60 / No. 18: Progress Toward Interruption of Wild Poliovirus Transmission — Worldwide, January 2010–March 2011, May 13, 2011*.
79. World Health Organization. *Routine vaccination coverage, 2010*. *Wkly Epidem Rec* 2011;86:509–13.
80. *Morbidity and Mortality Weekly Report (CDC) Weekly / Vol. 61 / No. 19: Progress Toward Interruption of Wild Poliovirus Transmission — Worldwide, January 2011–March 2012 - May 18, 2012*.
81. CDC. *Tracking progress toward global polio eradication—worldwide, 2009–2010*. *MMWR* 2011;60:441–5.
82. www.unicef.org/immunization/polio/.
83. *Who Epidemiological Brief n.13 Measles outbreaks and importation of wild poliovirus in the European Region, 6 March 2011*.
84. *WHO Epidemiological Brief n.11 Importation of Wild Poliovirus and Response Measures in the European Region, 16 December 2010*.
85. *WHO Epidemiological Brief n.12 Importation of Wild Poliovirus and Response Measures in the European Region - 7 February 2011*.

86. WHO Epidemiological Brief n.15 Measles outbreaks and response to importation of wild poliovirus - June 2011.
87. Who Epidemiological Brief n.14 Measles outbreaks, rotavirus surveillance and response to importation of wild poliovirus - August 2011.
88. WHO Epidemiological Brief n.23 Update on measles and rubella, regional and global polio outbreak status - April 2012.
89. Poliomyelitis Outbreak — Republic of the Congo, September 2010–February 2011 *mmwr* 18 marzo 2011.
90. World Health Organization. *Field guide for supplementary activities aimed at achieving polio eradication*. Geneva, Switzerland: World Health.
91. **Christopher J. Gregory, Serigne Ndiaye, Minal Patel, Elisaphan Hakizamana, Kathleen Wannemuehler, Edouard Ndinga, Susan Chu, Pascal Talani, and Katrina Kretsinger.** *Investigation of Elevated Case-Fatality Rate in Poliomyelitis Outbreak in Pointe Noire, Republic of Congo, 2010 - Clinical Infectious Diseases 2012; 55 (10): 1299-306.*
92. *Weekly epidemiological record: Progress towards eradicating poliomyelitis - Nigeria, January 2010-June 2011, 12 August 2011.*
93. *Morbidity and Mortality Weekly Record (CDC) Weekly / Vol. 61 / No. 42: Progress Toward Poliomyelitis Eradication — Chad, January 2011–August 2012, October 26, 2012.*
94. *Morbidity and Mortality Weekly Report (CDC) Weekly / Vol. 61 / No. 19: Progress Toward Interruption of Wild Poliovirus Transmission — Worldwide, January 2011–March 2012 - May 18, 2012.*
95. CDC. *Tracking progress toward global polio eradication, 2010–2011. MMWR 2012;61:265–9.*
96. *Annual Report GPEI, 2011.*
97. EXECUTIVE BOARD EB132/17, 132nd session 14 December 2012 poliomyelitis: intensification of the global eradication initiative.
98. GPEI Polio eradication and endgame Strategic Plan 2013-2018 DRAFT: 7 December 2012.
99. WHO/EPI/GEN/97.01 “Manual for the virological investigation of polio”.
100. Severini GM, Maestroni L, Falaschi A, Camerini F, Giacca M. Nested Polymerase Chain Reaction for high-sensitivity detection of Enteroviral RNA in biological samples, *J Clin Microbiol* - 1993; 31(5):1345-1349 .
101. Sixty-Fifth World Health Assembly. *Poliomyelitis: intensification of the global eradication initiative*. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2012. Available at http://apps.who.int/gb/ebwha/pdf_files/wha65/a65_20-en.pdf. Accessed October 19, 20.
102. *Report of the Independent Monitoring Board of the Global Polio Eradication Initiative November 2012.*
103. Sir J. Smith, R. Leke, A. Adams and R. H. Tangermann. *Certification of polio eradication: process and lessons learned - Bulletin of the World Health Organization, January 2004, 82 (1).*

104. WHO *Global action plan for laboratory containment of wild polioviruses, 2nd ed.* Geneva: World Health Organization; 2003.
105. *Annual Report GPEI, 2010.*
106. Sachs A., *Physical and functional interactions between the mRNA cap structure and the poly(A) tail, in Translational Control of Gene Expression, 2000; 447-465.*
107. Kubli D., Steffen R. et al., *Importation of poliomyelitis to industrialized nations between 1975 and 1984: evaluation and conclusions for vaccination recommendations, Br Med J 1987; 295: 169-171.*
108. Salazar-Grueso E.F., Roos R.P., Jubelt B., Cashman N.R., *Immune responses in the post-polio syndrome, N Engl J Med 1992; 326: 641.*
109. *Ministero della Salute – Eradicazione della poliomielite.*
110. *Rivista ufficiale in lingua italiana del Rotary International – n. 10 di novembre 2012.*
111. *Network Italiano dei servizi di Vaccinazione – Poliomielite; Ministero della Salute – Eradicazione della poliomielite.*
112. *Network Italiano dei servizi di Vaccinazione – Poliomielite; Ministero della Salute – Eradicazione della poliomielite.*
113. CDC. *Progress toward poliomyelitis eradication—India, January 2010– September 2011. MMWR 2011;60:1482–6.*
114. www.virology-online.com.
115. Severini G.M., et al, 1993.