

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI MILANO

Scuola di dottorato in Scienze Biomediche Cliniche e Sperimentali
Dipartimento di Scienze Biomediche per la Salute

Dottorato di Ricerca in Sanità Pubblica

Ciclo XXVIII



Contributo al progetto OMS di
eradicazione della poliomielite: risultati
delle attività di sorveglianza in
Lombardia

Area 06 – Scienze Mediche; Settore MED/42 - Igiene Generale e Applicata

Tutor: Dr. Sandro BINDA

Coordinatore: Chiar.ma Prof.ssa Elisabetta TANZI

Tesi di dottorato di
Laura PELLEGRINELLI
Matricola R09947

Anno Accademico 2014 - 2015

*A Giorgia e Iacopo,
che il destino mi ha regalato.
Ad un amore che non può
essere eradicato.*

Indice

Abstract	1
Premesse	5
1. Introduzione	7
1.1. <i>La poliomielite</i>	8
1.1.1. <i>La poliomielite. Cenni storici e prime descrizioni</i>	8
1.1.2. <i>La poliomielite. Le prime epidemie</i>	10
1.1.3. <i>La poliomielite. Aspetti epidemiologici</i>	12
1.1.4. <i>La poliomielite. Aspetti clinici</i>	12
1.1.5. <i>Poliomielite. Sintomatologia e patologia</i>	15
1.1.6. <i>Poliomielite. Prognosi</i>	17
1.1.7. <i>Poliomielite. Diagnosi</i>	17
1.2. <i>Il Poliovirus</i>	18
1.2.1. <i>Tassonomia e caratteristiche del genere Enterovirus</i>	18
1.2.2. <i>Il Poliovirus. Organizzazione del genoma e struttura del virione</i>	21
1.2.3. <i>Il Poliovirus. Ciclo replicativo ed effetti sulla cellula ospite</i>	24
1.2.4. <i>Il Poliovirus. Patogenesi</i>	27
1.2.5. <i>Il Poliovirus. La risposta immunitaria</i>	29
1.2.6. <i>Il Poliovirus. Terapia delle infezioni sintomatiche</i>	31
1.3. <i>I vaccini</i>	32
1.3.1. <i>Vaccino a virus inattivato di Salk: IPV (Inactivated Polio Vaccine)</i>	32
1.3.2. <i>Vaccino a virus vivo e attenuato di Sabin: OPV (Oral Polio Vaccine)</i>	34
1.3.2.1. <i>Polio-paralisi associata al vaccino (VAPP)</i>	37
1.3.2.2. <i>Poliovirus di derivazione vaccinale (Vaccine-Derived PV - VDPV)</i>	38
1.3.1. <i>Vaccini orali vivi attenuati: monovalenti e bivalenti</i>	41
1.4. <i>Progetto mondiale di eradicazione della poliomielite</i>	43
1.5. <i>Copertura vaccinale mediante la vaccinazione di routine</i>	47
1.5.1. <i>Il calendario vaccinale anti-polio in Italia</i>	48
1.5.2. <i>Livelli immunitari di anticorpi antipolio in Italia</i>	50
1.6. <i>Traguardi nella lotta all' eradicazione della polio</i>	51
1.7. <i>Recenti epidemie di Polio</i>	55
1.7.1. <i>Epidemia in Tagikistan</i>	55
1.7.2. <i>Epidemia in Siria</i>	58
2. Protocolli, Materiali e Metodi	60
2.1. <i>La sorveglianza delle PFA</i>	61
2.1.1. <i>Organizzazione della sorveglianza delle PFA in Italia ed in Lombardia</i>	63
2.1.2. <i>Raccolta e processamento dei campioni biologici per caso di PFA</i>	65
2.2. <i>La sorveglianza ambientale</i>	66
2.2.1. <i>Organizzazione della Sorveglianza ambientale in Italia e in Lombardia</i>	67
2.2.2. <i>Campionamento e trattamento dei reflui ambientali</i>	68
2.3. <i>Protocolli in uso per la rilevazione di PV ed EVNP</i>	69
2.3.1. <i>Isolamento in coltura cellulare</i>	69
2.3.2. <i>Test di tipizzazione sierologica di PV isolati</i>	71

2.3.3.	<i>Titolazione degli anticorpi neutralizzanti PV</i>	72
2.4.	<i>Identificazione e caratterizzazione degli EV</i>	74
2.4.1.	<i>Analisi statistica</i>	74
3.	Risultati	75
3.1.	<i>Sorveglianza delle PFA dal 2012 al 2015</i>	76
3.1.1.	<i>Case report di VAPP, 2014</i>	80
3.2.	<i>Sorveglianza ambientale dal 2012 al 2015</i>	82
4.	Discussione	84
5.	Allegati	90
6.	Bibliografia	94

Abstract

Although in 2015 poliovirus (PV) transmission has been reported at the lowest levels ever recorded, the virus is still endemic in two countries – Afghanistan and Pakistan. Until PV transmission is interrupted in these countries, all countries remain at risk of virus importation - especially vulnerable countries with weak public health and immunization services and travel or trade links to endemic countries. The high levels of immigration flows across the Mediterranean Sea jeopardize Italy for PV reintroduction.

The “WHO Strategic Plan of the Global Polio Eradication Initiative” indicates the nationwide surveillance of Acute Flaccid Paralysis (AFP) as the gold standard for detecting cases of poliomyelitis. In addition, systematic Environmental Surveillance (ES), seeking the presence of PV in sewage, is recognized as a powerful tool to confirm PV circulation in absence of AFP cases, especially in polio-free countries. In Italy, nationwide AFP surveillance has been set up in 1997, and ES has been established since 2005 in Milan and other five Italian cities (Bolzano, Parma, Sassari, Napoli and Palermo).

This PhD project aimed at evaluating these two public health surveillance systems ongoing in Lombardy (Northern Italy) in the period spanning from 2012 to 2015, in order to improve their quality and efficiency, and to achieve the WHO criteria. The results of surveillance activities were described and the assessment of system attributes (including data quality, sensitivity and timeliness) were discussed. Additionally, in the framework of the ES, the circulation and characterization of non-polio Enterovirus (NPEV) was evaluated in the study population.

The surveillance activities were carried out according to WHO guidelines from January 2012 to October 2015. For AFP surveillance, all children <15 years who met the WHO definition of AFP case were enrolled, and the collection of

stool and serum samples from each case was requested. For ES, wastewater samples were collected twice a month at the intel of 3 wastewater treatment plants located in Milan. Stool specimens collected from AFP cases and wastewater samples were analyzed to detect PV and NPEVs by virus isolation in RD (human rhabdomyosarcoma) and L20B (murine transgenic L cells) cell cultures, and by PCR assay specific for the 5' noncoding region [5'NCR] (nucleotide [nt]: 179-575). The identified viruses were genotyped by sequence analysis of the VP1 gene (nt. 2602-2977).

In order to define the serological status/immunity against PV, serum samples collected from AFP cases were analyzed by microneutralization assay against PV1, PV2, and PV3. According to WHO, an antibody titre $\geq 1:8$ was considered protective.

From January 2012 to October 2015, 52 AFP cases were reported in Lombardy with an incidence rate of 1.04/100'000 children <15 years of age. The median age of AFP cases was 5.8 years [inter-quartile range (IQR): 10.0 years]; no gender difference was observed. The annual incidence rates were 0.8/100'000 in 2012, 1.5/100'000 in 2013, 1.1/100'000 in 2014, and 0.6/100'000 in 2015 (preliminary data up to October). According to the WHO, the sensitivity of the AFP surveillance system is considered adequate when at least one case of AFP is detected annually per 100'000 children aged less than 15 years. As in 2012 the sensitivity of the surveillance system did not met this criterion, several interventions were implemented to raise awareness among the parts involved in the surveillance. On purpose, reports on the AFP notified weekly by sentinel hospitals were sent out quarterly to all physicians involved in the surveillance system along with epidemiological alerts and bulletins on PV circulation and polio endgame. Phone and e-mail contacts were kept with physicians who reported AFP cases to guarantee the adequacy of notification. Moreover, a workshop on PV and its surveillance system was arranged in collaboration with regional and national (ISS) public health authorities. These actions allowed the

sensitivity of the AFP surveillance system to meet the WHO criterion from 2013 onwards.

The WHO recommends completing the case investigation by virological analysis of stool samples in at least 80% of AFP cases: during our study, this rate was achieved in 2014 and 2015 (85.7%), whereas in 2012 and 2013 the analysis was completed in 63.6% and 60% of stool samples, respectively. The improvement of virological investigation completeness of AFP cases since 2014 was probably due to the raised awareness of physicians involved in the surveillance.

About 40% (21/52) of AFP cases were diagnosed as Guillain-Barré syndrome, 23.1% (12/52) and 19.2% (10/52) were ascribed to genetic disease and myelitis, respectively. Most (35/52; 67%) of AFP cases were reported by pediatric wards during summer and winter. According to virological results, no AFP case was caused by a PV infection, even though one AFP case (that occurred in 2014 in a 6-month boy affected by Bruton disease who received the first dose of oral polio vaccine in Albania) was characterized as a vaccine associated paralytic paralysis (VAPP). NPEVs were detected in 6 AFP cases (10.5%): 2 were Echovirus-11, 1 was Echovirus-6, and the remaining 3 were not genotyped. Serological investigation was carried out in 48 (48/52: 92.3%) AFP cases and a protective antibody titre (neutralising antibodies titre $\geq 1:8$) was detected in 94% (45/48) of individuals.

In the framework of the ES, 273 wastewater samples were collected and no PVs were isolated. In contrast, NPEVs were detected in 65.2% (172/273) of tested samples. The proportion of NPEVs detected in sewage by year was 70% (42/60) in 2012, 56.9% (41/72) in 2013, 66.7% (48/72) in 2014 and 68.3% (41/60) in 2015 (up to October). In 2013 the rate of NPEVs detected was significantly lower ($p < .05$) than those recorded in the other years of study. The WHO declares that at least 30% of samples collected in the ES setting have to be positive for NPEV, thus our results demonstrated the good performance of the ongoing surveillance system in the whole study period. All NPEVs were

characterized as EV belonging to species B: Echovirus-11 and Echovirus-6 were the most frequently detected viruses, being the 29.1% (41/141) and 20.6% (29/141) of genotyped NPEVs, respectively. No difference among the NPEV genotypes circulating in the three wastewater treatment plants was identified.

It is important to strengthen surveillance of AFP cases at regional and national level in order to detect rapidly any virus importation or emergence and enable a prompt public health response. Although AFP surveillance remains the gold standard, systematic ES is a powerful tool to detect PV in the absence of polio cases, especially in polio-free countries. During our study, AFP surveillance met the WHO criteria for sensitivity from 2013 onwards and the level of completeness of case investigation improved significantly from 2014. Physicians involved in the activities have proved to give special attention to AFP surveillance thanks to several initiatives implemented since 2013, such as the sharing of surveillance reports, epidemiological alerts and updates on polio eradication progress. Epidemiological features of AFP cases were similar to those reported in the current scientific literature and our data confirm adequate levels of immunization in population as well as the absence of wild PV infections. ES was suitable to investigate EV circulation in the population and the high rate of NPEV detected underlines a massive virus circulation. No silent PV reintroduction was noted during ES.

As long as in the current polio endgame PV outbreaks reflect serious gaps in immunity to PV due to the weakness of routine immunization coverage in otherwise polio-free countries, all populations should maintain uniformly high immunization coverage at the district level to minimize the consequences of any virus introduction. Keeping strong and encouraging both AFP surveillance and ES all over the world is crucial to ensure the PV will not return unnoticed and, finally, to achieve the global eradication goal.

Premesse

La poliomielite è una malattia acuta virale altamente contagiosa causata dai tre sierotipi di Poliovirus (PV) che colpisce principalmente i bambini di età inferiore a 5 anni. Il PV si trasmette per di più per via oro-fecale sebbene trasmissioni respiratorie siano possibili; una volta instaurata l'infezione, i PV possono raggiungere il sistema nervoso centrale attraverso la barriera emato-encefalica, tramite il torrente ematico o attraverso le fibre nervose dando diversi tipi di manifestazioni cliniche tra cui la poliomielite paralitica.

La poliomielite è stata per molto tempo endemica, anche a livello italiano, ma con l'impiego dei vaccini di Sabin (OPV) e di Salk (IPV) e con il lancio da parte dell'OMS della Global Polio Eradication Initiative a partire dagli anni '60, le grandi epidemie sono rapidamente scomparse, ed ad oggi solamente due Paesi, Pakistan ed Afghanistan, rimangono endemici per PV. Nonostante i casi di poliomielite siano oggi diminuiti del 99% rispetto al 1988, PV esiste ancora ed epidemie come quelle registrate in Tajikistan nel 2010 ed in Siria nel 2013 a seguito di reintroduzione del virus, sono l'evidenza che dimostra come i sistemi di sorveglianza verso PV debbano proseguire ed incrementare in quest'ultima fase del progetto mondiale di eradicazione. Oggigiorno globalmente la sorveglianza delle Paralisi Flaccide Acute (PFA) è considerato il gold standard per la sorveglianza della polio sebbene la sorveglianza ambientale (ES) svolta attraverso la ricerca di virus nei reflui urbani abbia mostrato di permettere l'identificazione di PV di reintroduzione nella popolazione in assenza di sintomi clinici. Inoltre, disporre di campioni ambientali raccolti per la ricerca del PV rende possibile lo studio degli Enterovirus non-polio circolati nella popolazione afferente al depuratore in studio.

L'Italia, così come tutta la regione Europea OMS, è stata ufficialmente certificata "polio-free" il 21 giugno 2002, ma a causa della sua posizione

geografica, è un importante crocevia di popoli migratori e considerata da OMS a rischio di re-introduzione di PV. Dal 1997 la sorveglianza delle PFA è svolta in Italia a livello regionale, mentre la ES è stata attivata in solo 6 città, tra cui Milano, a partire dal 2006; da sempre, il laboratorio di Virologia del Dipartimento di Scienze Biomediche per la Salute è Centro di Riferimento Regionale per le attività di sorveglianza del PV.

In questo progetto di dottorato sono state valute le attività di sorveglianza delle PFA ed ES in Lombardia (Nord-Italia) nel periodo compreso tra gennaio 2012 ed ottobre 2015 con lo scopo di aumentarne l'efficienza e di raggiungere i criteri di sensibilità e completezza delle indagini virologiche richiesti da OMS. Sono state inoltre descritte le caratteristiche epidemiologiche dei casi di PFA registrati nel periodo in studio ed è stato riportato il caso di una paralisi vaccino-derivata occorsa in un bambino albanese di 6 mesi affetto da morbo di Bruton vaccinato con la prima dose di OPV. In ultimo, è stata valutata la quota ed i genotipi di EVNP circolati nella popolazione in studio dal 2012 al 2015

1. Introduzione

1.1. La poliomielite

1.1.1. La poliomielite. Cenni storici e prime descrizioni

Il termine poliomielite deriva dal greco *poliós* (πολιός) che significa "grigio", *myelós* (μυελός) che si riferisce al midollo spinale, e il suffisso *-itis*, che indica l'infiammazione della paralisi dei muscoli respiratori.

Da ritrovamenti storici pare che epidemie di poliomielite fossero già presenti fin dall'antichità; uno dei primissimi casi, è stato scoperto dagli archeologi in una mummia egiziana che morì circa intorno al 3700 A.C e che presentava i tipici segni clinici della malattia [1].

Un altro esempio risalente al 1400 a.C., mostra un giovane sacerdote egiziano intarsiato in un bassorilievo di pietra appoggiato su una stampella con una piede deformato, con la caratteristica posa di un arto colpito dalla polio.

La poliomielite venne 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 infettivo, 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 ebbe un'ulteriore descrizione da parte di un medico italiano, Giovanni Battista Monteggia che la definì con i termini di "paralisi e atrofia"; venne 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. Per tali motivi nel 1860 pubblicò la seconda edizione del suo libro intitolato: "paralisi spinale infantile". Le descrizioni che J. Heine, insieme con il suo allievo K. O. Medin, avevano dato della malattia sono così dettagliate e importanti al punto che la poliomielite veniva 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. 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.

In quegli anni 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 proveniente da pazienti che manifestavano la malattia,, essi riprodussero l'infezione che si manifestò in una malattia con un decorso simile a quello dell'uomo, concludendone per la sua natura virale.

Nel frattempo era maturata la constatazione che l'infezione, quando si concludeva in modo favorevole, era seguita dallo sviluppo di 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 la vaccinazione.

1.1.2. La poliomielite. 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.

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.

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. 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.

Uno studio della Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) pubblicato nel 1955 comparava l'estensione dell'infezione poliomielitica negli anni Venti del XX Secolo in una serie di Paesi: il PV si dimostrava diffuso in tutto il mondo specie nei paesi industrializzati, dove nel periodo tra il 1920 e il 1953 si riscontrarono livelli tali da raggiungere tra i 30 e i 58 casi annuali per ogni 100.000 abitanti [2] con punte di massima incidenza nei paesi nordici.

Dal 1951 al 1955 la poliomielite aveva paralizzato circa 28.500 bambini/all'anno nei Paesi della Regione Europea, con 8.377 casi nel 1958 in Italia

In America ci furono sporadiche notizie di poliomielite fin dal 1841, e la prima epidemia si verificò nel 1894 vicino a Rutland nel Vermont, allargandosi poi a tutti gli stati degli USA e in Canada con oltre 25.000 casi al 1913.

L'epidemia più importante e famosa di polio fu quella registrata nel 1916, con più di 9.000 casi segnalati nella sola città di N.Y., facendo più di 1.400 morti e creando panico nella società. La maggioranza degli individui che furono colpiti avevano meno di 5 anni; il che portò al nome di "paralisi infantile". Nonostante i medici avessero già identificato il virus della poliomielite nel 1908, ci fu una

grande speculazione da parte dell'opinione pubblica circa le cause di questa malattia così spaventosa, includendo qualsiasi cosa: dai gatti randagi alle barbe dei medici fino alle onde radio.

Cinque anni dopo l'epidemia del 1916, F.D. Roosevelt contrasse la paralisi flaccida all'età di 39 anni e il corso della storia della polio fu cambiato per sempre. Nonostante le sue gambe fossero paralizzate F.D. Roosevelt non perse mai la fiducia che un giorno potesse camminare di nuovo. Con straordinario coraggio e spirito di abnegazione, continuò la sua carriera politica e la sua vita privata, mascherando il suo handicap. Con il passare degli anni, durante le sue frequenti visite a Warm Springs, (la grande Mecca da lui fondata nel sud della Georgia), F.D.R. rimase in contatto con i sopravvissuti alla polio e supportò la ricerca per migliori trattamenti e vaccini. Questo suo impegno portò infine alla creazione, nel 1937, della Fondazione Nazionale della paralisi infantile.

Durante i successivi due decenni la Fondazione giocò un ruolo centrale per raccogliere i fondi necessari per sviluppare vaccini contro la poliomielite. Tra gli anni 30 e 50 le epidemie di poliomielite sembrarono inarrestabili, diventando sempre più mortali, creando un clima di terrore.

Entro il 1953 morirono più bambini americani di poliomielite paralitica che di qualsiasi altra malattia trasmissibile. A differenza dell'AIDS, la poliomielite colpiva chiunque. Le famiglie stavano a casa, le piscine venivano chiuse, gli eventi pubblici erano cancellati. I bambini in particolare erano a rischio, specialmente durante i mesi caldi dell'estate. Come commentò un osservatore, sembrava che la poliomielite andasse a cercare i bambini. La poliomielite colpiva più i maschi che le femmine. Nelle classi sociali medie e alte la poliomielite paralitica era più comune che nelle classi basse [3].

La spiegazione per questa differenza socio-economica era che i bambini delle classi inferiori, i quali tendono ad avere un maggiore affollamento e meno igiene, venissero esposti al virus ad un'età molto giovane, quando la malattia generalmente era più mite e il sistema immunitario era già acquisito.

Dopo l'introduzione della vaccinazione negli anni '50, la malattia subì una

drastica riduzione del numero di casi in tutto il mondo fino quasi a scomparire.

1.1.3. La poliomielite. Aspetti epidemiologici

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

In epoca pre-vaccinale 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. 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 [3].

1.1.4. La poliomielite. Aspetti clinici

La poliomielite può colpire persone di ogni età ma generalmente affligge i bambini al di sotto dei 5 anni [3]. La diffusione avviene per contatto diretto o indiretto attraverso la via oro-fecale. Una volta entrato nell'organismo attraverso la bocca, il virus raggiunge l'intestino dove inizia a replicarsi. È in seguito al

rilascio di PV nell'ambiente attraverso le feci che il virus diffonde rapidamente in una comunità, specialmente in situazioni di igiene e condizioni sanitarie precarie. Se un numero sufficiente di persone è però completamente immunizzato contro il PV, il virus non è in grado di incontrare soggetti suscettibili da infettare e muore. La maggior parte delle persone (circa il 90-95%) entrate a contatto diretto con PV non presentano alcuna manifestazione clinica oppure presentano sintomi aspecifici e non riconducibili all'infezione da PV cosicché non verranno mai a conoscenza di essere state infettate. Questi soggetti, poiché continuano ad eliminare il virus, sono in grado di infettarne altri se non vaccinati o venuti precedentemente a contatto con PV prima che si manifesti un caso di paralisi tipica della poliomielite. Anche se la paralisi è il segno più visibile della presenza del virus, solo circa l'1% delle infezioni risultano in malattia clinica riconosciuta: nella maggior parte degli individui passano inosservate. La poliomielite è quindi una "malattia invisibile": per questo tenere sotto controllo la comparsa dei casi di paralisi non garantisce l'individuazione della diffusione del virus. Alla luce di questo, l'OMS valuta il rilevamento di un singolo caso confermato di paralisi da PV quale evidenza di un'epidemia in atto.

Quando un individuo suscettibile all'infezione è esposto al PV, a seconda dei vari livelli a cui si arresta il progredire dell'infezione (mucoso, linfatico, ematico, meningeo, nervoso) si hanno diverse evenienze [4]:

- **INFEZIONE INAPPARENTE:** senza sintomi o di scarsissima rilevanza clinica
- **POLIOMIELITE ABORTIVA:** è la forma non differenziata e più comune della malattia ed è caratterizzata da sintomi aspecifici quali febbre, malessere, sonnolenza, cefalea, mialgie, a volte con modici segni di enterite (nausea, vomito, costipazione) o di faringite in varie combinazioni. Il paziente si riprende in pochi giorni (da 3 a 4). Tale forma è definita anche come "malattia minore estiva", perché è sul finire

dell'estate che si manifesta più frequentemente. La diagnosi di poliomielite abortiva non può essere fatta con sicurezza, perfino durante un'epidemia, tranne quando il virus viene isolato o si misura lo sviluppo degli anticorpi specifici (una loro comparsa successivamente ai sintomi prova l'avvenuta esposizione al virus). In questa fase i virus possono essere isolati da feci, secrezioni faringee e sangue [4].

- **POLIOMIELITE NON PARALITICA O MENINGITE ASETTICA:** non presenta segni clinici distintivi rispetto a quelli provocati da altri virus (il PV è solo uno dei tanti virus che danno meningite asettica). È una manifestazione febbrile che si ha in una minoranza dei casi, quando la malattia non si arresta, in aggiunta ai sintomi e ai segni già citati: in genere dopo 2-7 giorni asintomatici si manifestano torpore psichico, rigidità e dolore dorso-nucale e aumento della pressione, delle proteine e delle cellule del liquor. Ha decorso breve (da 2 a 10 giorni) e prognosi favorevole, con ripresa rapida e completa.
- **POLIOMIELITE PARALITICA O PARALISI FLACCIDA ACUTA (PFA):** può seguire la malattia minore sopra descritta ma di solito si presenta senza uno stadio prodromico. Esordisce con febbre, cefalea, vomito e rachialgia. In 24-48 ore compaiono le paralisi flaccide accompagnate da dolori e spasmi muscolari, che colpiscono più frequentemente gli arti e soprattutto le gambe, a causa della lesione dei motoneuroni inferiori. Il coinvolgimento muscolare di solito è massimo entro pochi giorni dopo l'inizio della fase paralitica. L'entità del danno e della distruzione varia da caso a caso.

Oltre alle forme spinali si manifestano anche forme bulbari. Danni in questa regione del cervello colpiscono i nervi cranici ed i muscoli da essi innervati, producendo manifestazioni cliniche tipiche dell'encefalite e difficoltà di respirazione, di parola e di deglutizione. Infine, nella paralisi bulbo-spinale, i sintomi che si presentano sono sia a livello bulbare che a

livello spinale. Nella poliomielite paralitica la prognosi dipende strettamente dall'entità e dal tipo delle lesioni e dei plessi infettati: ha tuttavia un decorso più grave negli adulti.

La paralisi irreversibile da PV colpisce circa 1 su 200 infetti e presenta le seguenti caratteristiche:

- È flaccida cioè comporta perdita del tono muscolare ed anche della massa del muscolo colpito, che appare più piccolo del normale, floscio e senza vita
- È asimmetrica cioè non colpisce in modo uguale i muscoli dei due lati del corpo, ma spesso solo quelli di un lato
- È non contigua cioè a distribuzione irregolare

- **SINDROME POST POLIO (PPS = Post-Poliiovirus Syndrome)**

Circa il 40% delle persone che sopravvivono alla poliomielite paralitica sviluppano sintomi addizionali 15-40 anni dopo la malattia primaria. Questi sintomi, chiamati sindrome post polio, includono una nuova e progressiva debolezza muscolare, grave affaticamento e dolore nei muscoli e nelle articolazioni. Ad oggi ancora non è noto il motivo per cui solo una piccola percentuale di infetti sviluppa la PPS [5].

1.1.5. Poliomielite. Sintomatologia e patologia

La paralisi è la manifestazione più evidente dell'infezione da PV, 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

[6]. 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. Non sono chiari i motivi che portano un individuo a sviluppare la forma più grave di polio, ma tra i fattori di rischio l'OMS cita [6]:

- 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

Una minima parte delle infezioni, circa 1/200, porta a una paralisi irreversibile, in particolare 1 su 1.000 bambini e 1 su 80 giovani adulti. Circa il 5-10% dei malati muore a causa della paralisi dei muscoli dell'apparato respiratorio [6]. 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 [6].

1.1.6. Poliomielite. 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.

1.1.7. Poliomielite. Diagnosi

Fondamentalmente la diagnosi è di tipo clinico-epidemiologica. La presenza di un individuo con la paralisi da polio è indice di un focolaio epidemico ma nelle forme non paralitiche, la diagnosi clinica è impossibile.

L'accertamento diagnostico è possibile mediante l'isolamento in coltura cellulare del virus da campioni fecali 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. Parallelamente, le tecniche di biologia molecolare permettono di evidenziare la presenza dell'RNA virale, e la distinzione tra PV selvaggio e derivato dal vaccino.

Le indagini sierologiche vengono effettuate tramite la rilevazione

dell'aumento di almeno quattro volte del titolo anticorpale (anticorpi neutralizzanti e fissanti il complemento) in 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.

1.2. Il Poliovirus

1.2.1. Tassonomia e caratteristiche del genere *Enterovirus*

Gli Enterovirus (EV), 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. Appartengono alla famiglia delle *Picornaviridae* e sono caratterizzati dal possedere il nucleocapside e di forma sferica (diametro di 28-30 nm) e formato da capsidi in assenza di envelope lipidico. Il capsido icosaedrico è costituito da 32 capsomeri ed è composto da 4 proteine: VP1-VP2-VP3-VP4. Il loro genoma è costituito da RNA lineare a singolo filamento (single strand RNA, ssRNA) di 7.2-8.5 Kb a polarità positiva. 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 2,5-2,8.106 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

ericapsidiche;

- in sospensione acquosa vengono distrutti se riscaldati a 50-55°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°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 MgCl₂ (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:

- PV
- Coxsackievirus A e B
- Echovirus

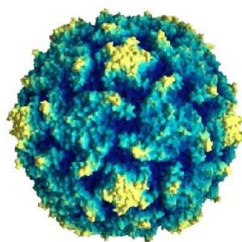
La nomenclatura odierna, basata su rigorosi confronti delle omologie del genoma virale, ha prodotto la seguente classificazione:

1. Enterovirus A: Human enterovirus A

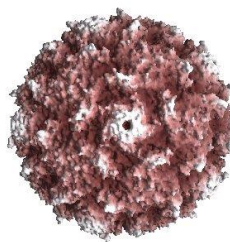
- | | |
|-------------------|------------------------------|
| 2. Enterovirus B: | Human enterovirus B |
| 3. Enterovirus C: | Human enterovirus C |
| 4. Enterovirus D: | Human enterovirus D |
| 5. Enterovirus E: | Bovine enterovirus (group A) |
| 6. Enterovirus F: | Bovine enterovirus (group B) |
| 7. Enterovirus G: | Porcine enterovirus B |
| 8. Enterovirus H: | Simian enterovirus A |
| 9. Enterovirus J: | Unclassified simian viruses |
| 10. Rhinovirus A: | Human rhinovirus A |
| 11. Rhinovirus B: | Human rhinovirus B |
| 12. Rhinovirus C: | Human rhinovirus C |

Escludendo i Rhinovirus, gli EV di interesse umano risultano essere limitati a:

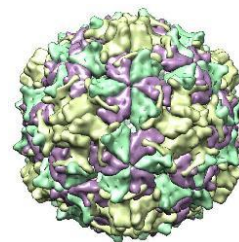
- PV rimasti immutati in numero e denominazione e distinti in 3 tipi in base alle caratteristiche morfologiche (Figura 1):
1. Tipo 1: *Brunhilde*, dal nome dello scimpanzé da cui venne isolato per la prima volta (1939)
 2. Tipo 2: *Lansing*, dalla città del Michigan dove, nel corso di un'epidemia, un 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)



Tipo 1: *Brunhilde*



Tipo 2: *Lansing*



Tipo 3: *Leon*

Figura 1 - I tre tipi di PV (Fonte: microbiologybook.org)

- Enterovirus umani Gruppo A (10 sierotipi): Coxsackievirus A2, A3, A5, A7, A8, A10, A12, A14, A16 ed Enterovirus umano 71

- EVNP umani Gruppo B (36 sierotipi): Coxsackievirus A9, B1-B6, Echovirus 1-7, 9, 11-21, 24-27, 29-33 ed Enterovirus umano 69
- Enterovirus umani Gruppo C (11 sierotipi), che comprende 11 sierotipi: Coxsackievirus A1, A11, A13, A15, A17-A22 e A24
- 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. EV104, EV105, EV 106, etc.) [8].

Gli Enterovirus non-polio (EVNP) possono causare una grande varietà di sindromi cliniche (meningite, paralisi, miocarditi, eruzioni cutanee, malattie respiratorie, malformazioni congenite, congiuntivite e diabete mellito) molte delle quali benigne e autolimitanti. Dal 50 all'80% delle infezioni da EVNP sono completamente asintomatiche e comuni nell'infanzia [9].

Durante la replicazione gli Enterovirus possono andar incontro a mutazioni e/o ricombinazioni con i virus appartenenti allo stesso genere: questa situazione è potenzialmente pericolosa in quanto nuove varianti virali potrebbero emergere, rappresentando un problema di Sanità Pubblica. Tale evenienza è nota per i ceppi di PV in quanto è emersa l'affinità del PV verso alcuni genotipi di EVNP ed in particolare per i Coxsackievirus di specie C, gruppo A. Per questo motivo è importante che nella sorveglianza della poliomielite rientri non solo il monitoraggio dei ceppi selvaggi di PV ma anche quella di EVNP [10].

1.2.2. Il Poliovirus. Organizzazione del genoma e struttura del virione

Il genoma di PV è una molecola di RNA di 72-85 Kb, composto da circa 7.000 basi, a singolo filamento, con polarità positiva subito disponibile per

essere trascritta da una RNA-polimerasi codificata dal genoma del virus per poi essere tradotta sui ribosomi della cellula infettata. L'organizzazione del genoma di PV è la seguente:

VPg+5'UTRIRES-I[1A-1B-1C-1D/2Apro-2Bviro-2C/3A-3BVPg-3Cpro-3Dpol]3'UTR-poly(A).

L'RNA del PV è infettivo perché può fungere da RNA messaggero una volta rilasciato dal virione nel citoplasma della cellula ospite e quindi produrre tutte le proteine virali richieste per la sua replicazione [11].

Possiede una sola Open Reading Frame (ORF) che codifica per un'unica poliproteina che viene processata già durante la traduzione ad opera di una serie di proteinasi generando una dozzina di prodotti finali (proteine strutturali e non-strutturali). La poliproteina è costituita principalmente da tre regioni: P1, P2 e P3 che codificano rispettivamente per le proteine del capsido, le molecole coinvolte nel processamento del trascritto iniziale e nella replicazione [12]. La regione non codificante all'estremità 5' (5' UTR= Un-Translated-Region) è piuttosto lunga ed ha una struttura complessa che comprende le sequenze che regolano la trascrizione e la traduzione. Ad essa è legata covalentemente una proteina, VPg (VirionProtein, genomelinked), che non è indispensabile per l'infettività ma sembra avere la funzione di primer per la replicazione. La regione 3' è invece corta e contiene una struttura secondaria che sembra implicata nel controllo della sintesi dell'RNA virale. A questa estremità è legata una coda poliadenilata (poliA) indispensabile per l'infettività.

Il capsido di PV è composto da 60 copie di ciascuna delle 4 proteine di rivestimento: VP1, VP2, VP3 e VP4 più la proteina VP0, precursore di VP2 e VP4, che rimane non clivata fino all'inclusione dell'RNA nei nuovi capsidi. Una copia di ciascuna di queste proteine si assembla nell'unità di base del capsido, il protomero [11].

Il rivestimento proteico possiede alcune importanti funzioni:

- Protegge il genoma da nucleasi ambientali
- Riconosce specifici siti recettoriali codificati dalla cellula sulla membrana

plasmatica e può quindi essere un determinante importante per il range d'ospite e per la patogenesi della malattia

- Porta indicazioni per selezionare ed impacchettare il genoma virale e forse anche una proteinasi coinvolta nella maturazione del virione
- È il mezzo per penetrare la membrana plasmatica e distribuire il genoma virale nel citoplasma della cellula ospite suscettibile.

Il sierotipo virale è determinato dalle proteine esterne del capsid, che contengono i siti antigenici maggiori. Il PV ha tre sierotipi: PV1, PV2 e PV3; sono tutti estremamente virulenti e causano gli stessi sintomi della malattia.

La regione 5'-UTR contiene l'elemento IRES (*Internal Ribosome Entry Site*) che promuove l'inizio della traduzione dell'RNA messaggero (mRNA) [12].

Studi di biochimica e successivamente la determinazione della sequenza nucleotidica del genoma di PV 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 sono indicate rispettivamente con (Figura 2):

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

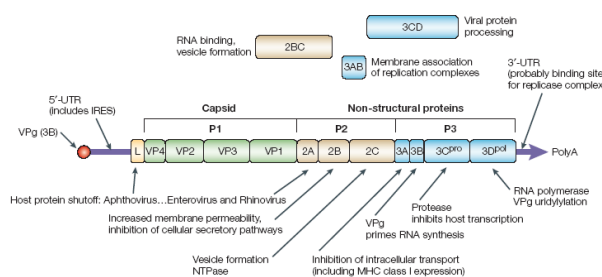


Figura 2 - Mappa del clivaggio della poliproteina (Fonte: viralzone.expasy.org)

Per quel che concerne la replicazione del genoma dei PV, 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* [12].

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 PV 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 [12]. Il virione del PV, analogamente agli altri picornavirus, ha una forma approssimativamente sferica con un diametro di 25-28 nm, privo dell'involucro lipidico con capsidi isometrico, a simmetria icosaedrica e 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]. Il sierotipo di PV è determinato dalle proteine esterne del capsidi, che contengono i siti antigenici maggiori.

1.2.3. Il Poliovirus. Ciclo replicativo ed effetti sulla cellula ospite

Il ciclo di replicazione virale all'interno della cellula ospite inizia con l'adesione del virione al recettore per PV HPVR (Human Polio Virus Receptor) (Figura 3) conosciuto anche come CD155. Il CD155 è una proteina integrale di membrana appartenente alla superfamiglia delle Immunoglobuline espressa a

livello membranoso. 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 PV [12]. Il locus per il recettore risiede sul cromosoma 19, il quale porta tutte le informazioni necessarie per l' accettazione dei PV da parte delle cellule umane: ciò suggerisce che un singolo gene codifica per la proteina recettoriale. Le cellule di alcuni distretti corporei dell'uomo (encefalo, fegato, polmoni, tonsille, placche del Peyer, placenta, cellule follicolari dendritiche e linfociti B) esprimono tale recettore pertanto possono essere infettate e uccise dal virus.

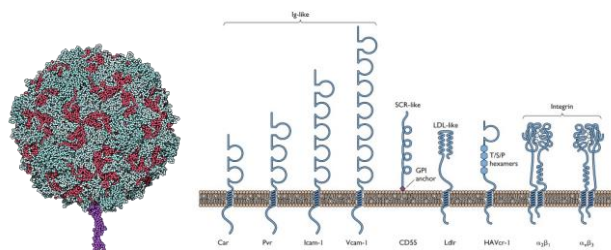


Fig. 3. Human Polio Virus Receptor (Fonte: viralzone.expasy.org)

È noto che le cellule murine non sono suscettibili all'infezione da PV perché mancano di recettori cellulari [14], 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 [15]. Ciò indica il ruolo cruciale del recettore HPVR nelle infezioni dei PV 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 [16]. Le cellule di topi modificate geneticamente in modo che esprimano tale recettore sono usate in laboratorio per l'isolamento del virus dai campioni biologici e chiamate L20b [17]. Il primo effetto prodotto dai PV 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 [13]. Tale fattore, opportunamente modificato tramite clivaggio ad opera della proteasi virale 2Apro perde la sua normale funzione, ma stimola la traduzione virale IRES-dipendente [18]. Il PV 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' [12]. Il virus inibisce la traduzione dell'mRNA cellulare e sfrutta l' apparato di sintesi proteica della cellula-ospite per tradurre in maniera efficiente i precursori per la sintesi delle componenti virali, il complesso di traduzione (ribosomi, enzimi, etc), 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 proteinasi 3Cpro non direttamente sulle RNA polimerasi, ma sulle proteine accessorie [18; 19]. A seguito dell'infezione da parte di PV 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 [12]. Un' ipotesi sul meccanismo che lo provoca riguarda il rilascio del contenuto dei lisosomi [20] (Figura 4).

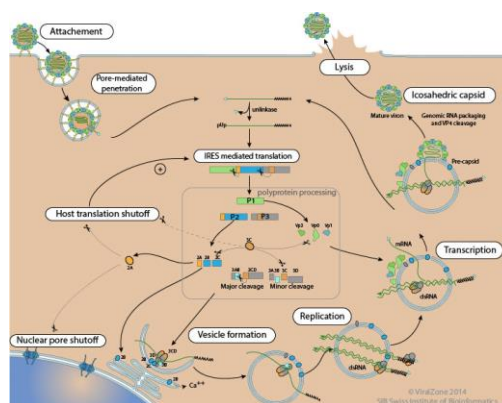


Figura 4 - Ciclo replicativo del polio virus (Fonte: viralzone.expasy.org)

1.2.4. Il Poliovirus. Patogenesi

Il PV penetra l'organismo ospite attraverso l'orofaringe dove si stabilisce nei tessuti del sito di infezione (tonsille e linfonodi del collo). La replicazione di PV dura circa 3-4 ore e ciascuna cellula infettata può produrre fino a centomila virioni. La cellula suscettibile fornisce l'energia ed i precursori per la sintesi dei componenti virali e tutto il necessario per la sintesi delle poliproteine e le membrane richieste per l'assemblaggio dei virioni.

I PV replicano a una temperatura ottimale di 37°C e presentano acido-resistenza a causa della mancanza dell'envelope lipidico; grazie a questa sua caratteristica il virus riesce a passare indenne attraverso lo stomaco e ad insediarsi molto precocemente nell'intestino. Inizialmente il virus si replica soprattutto a livello delle tonsille e delle placche del Payer, invade i linfonodi profondi e mesenterici e continua a replicarsi fino a dare la prima fase viremica (viremia minor). Spesso il sistema immunitario riesce a bloccare il virus a questo punto. In caso contrario il virus continua a replicarsi nell'apparato reticoloendoteliale e genera una seconda fase viremica (viremia major) [6] (Figura 5)

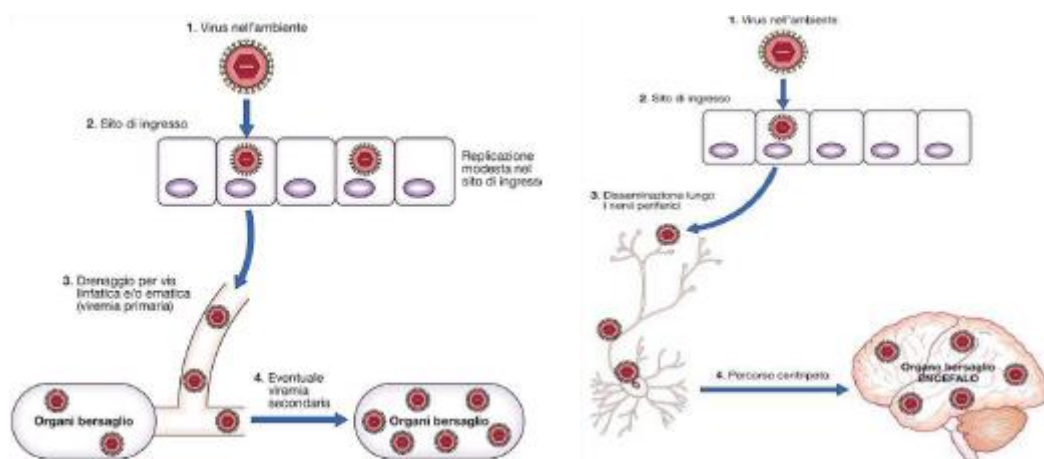


Figura 5. Infezione disseminata da polio virus (Fonte: immunopedia.org)

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 [4].

Sono noti due meccanismi di infezione del sistema nervoso centrale. Il primo, che consiste nel passaggio del virus attraverso la barriera ematoencefalica [21], è avvalorato dal fatto che la malattia paralitica da PV sia preceduta da una fase di "maggiore o seconda viremia" e che la presenza in circolo di anticorpi neutralizzanti possa prevenire la poliomielite. Sebbene la viremia sembra essere critica per l'ingresso del virus nel SNC, i PV sono anche in grado di utilizzare i 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.

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 e, 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 [4]. 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 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. 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 6) [6].

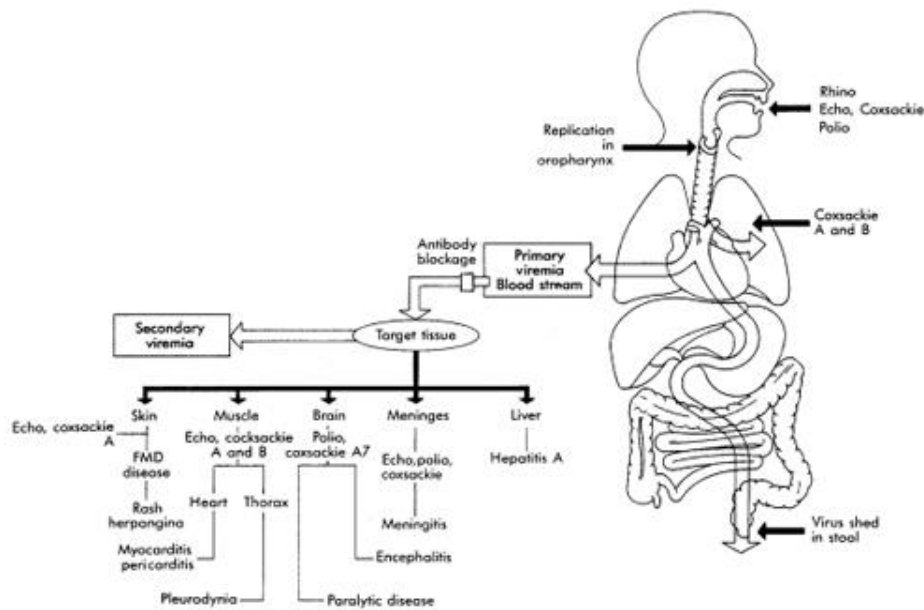


Figura 6 - Patogenesi delle infezioni da PV e altri Picornavirus (Fonte: meddean.luc.ed)

1.2.5. Il Poliovirus. 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 dipendono fortemente dalla sua capacità di evadere o resistere ai meccanismi protettivi dell'immunità.

L'infezione di PV, così come la somministrazione delle formulazioni vaccinali, comporta una risposta immunitaria specifica sia di tipo umorale (linfociti B) sia cellulo-mediata (linfociti T) che fa seguito sia alle forme

cl clinicamente manifeste sia a quelle inapparenti. In seguito all'esposizione naturale, le IgM e IgG compaiono nel siero circa 7-10 giorni dopo l'infezione. Livelli sufficientemente elevati possono bloccare l'ingresso del PV nel sistema nervoso centrale. Gli anticorpi sierici sono tipo specifici e si pensa che persistano per tutta la vita (soprattutto IgG) [6]. Un'indagine condotta in un villaggio esquimese isolato mostrò che gli anticorpi IgG prodotti in seguito a un'infezione subclinica con il virus selvaggio persistevano almeno 40 anni in assenza di successive esposizioni [22].

L'infezione da PV induce la produzione di anticorpi IgA secretori a 2-6 settimane dopo l'esposizione che permangono a bassi livelli [23]; è comunque possibile che in alcuni individui non si verifichi alcun incremento di IgA. Gli anticorpi secretori sono prodotti dalle cellule plasmatiche che originano dal tessuto linfoide associato all'intestino, soprattutto dalle placche del Peyer. Queste cellule sono localizzate nelle mucose, comprese quelle di intestino, faringe e ghiandole mammarie [24]. La persistenza di IgA secretorie può essere correlata alla virulenza del virus infettante e al numero di particelle virali presentate alla mucosa intestinale e nasale. Sono stati rilevati livelli apprezzabili di anticorpi secretori nelle secrezioni nasofaringee di individui tra i 10 e i 15 anni dopo l'infezione naturale con PV selvaggio di tipo 1 [24].

L'immunità passiva è trasmessa dalla madre al feto attraverso la placenta e dopo la nascita con l'allattamento. La concentrazione di anticorpi IgG neutralizzanti il tipo 1 e il tipo 2 nel neonato è approssimativamente uguale a quella della madre. I titoli verso il tipo 3 sono un po' più bassi, suggerendo un differente trasporto placentare di questo sierotipo [23]. Il tasso di decadimento degli anticorpi materni è costante; la loro emivita è stimata intorno ai 30 giorni (range da 21 a 50 giorni).

Quando il PV raggiunge l'intestino, nell'organismo si attiva una risposta anticorpale. Il virus o gli antigeni virali vengono intrappolati dalle cellule dendritiche follicolari nella zona delle cellule B dei tessuti linfoidei secondari mucosali come le placche del Peyer. Le cellule B che riconoscono gli antigeni

virali vengono attivate dai linfociti T helper CD4+ e si differenziano in plasma cellule che producono le IgM secretorie e le IgA. I linfociti T vengono attivati a loro volta dall'interazione con le cellule presentanti l'antigene come i macrofagi e le cellule dendritiche che hanno endocitato gli antigeni virali. Le cellule B presenti nella lamina propria dell'intestino liberano IgA dimeriche e IgM pentameriche. Le cellule epiteliali dell'intestino esprimono il poly-meric-immunoglobulin-receptor (PIgR) che si lega alla catena J delle IgA e delle IgM .

Il complesso recettore-anticorpo viene poi trasportato attraverso le cellule epiteliali dalla membrana basolaterale a quella apicale e rilasciato nel lume dell'intestino. Questi anticorpi opsonizzano PV nel lume legandosi agli antigeni espressi sulla superficie del virione riducendo così l'infettività e promuovendone la rimozione.

1.2.6. Il Poliovirus. Terapia delle infezioni sintomatiche

Dal momento che non esistono trattamenti specifici perché nessun farmaco si è rilevato efficace, nelle forme neurologiche gravi sono impiegate terapie di supporto. 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. È fondamentale il riposo a letto perché l'esercizio muscolare aggrava il danno estendendo la paralisi.

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.

Sfortunatamente, tutti i trattamenti appena elencati possono migliorare la mobilità residua, ma non sono in grado di far regredire una polio-paralisi permanente. In assenza di terapie farmacologiche efficaci, solamente la prevenzione della malattia attraverso la vaccinazione è in grado di proteggere l'individuo dalla poliomielite

1.3. I vaccini

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

L'IPV, detto anche vaccino di Salk dal nome del suo ideatore, è un preparato trivalente ottenuto coltivando separatamente i tre tipi di PV 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.

Poiché è trivalente produce immunità contro tutti e 3 i tipi di PV. La protezione contro la malattia paralitica correla con la presenza di anticorpi. IPV è altamente efficace nell'indurre una risposta immunitaria contro i PV 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% [6]. 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 PV 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 PV 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 [25].

Svantaggi. Uno dei maggiori svantaggi dell'IPV è che induce una scarsa immunità nel tratto gastrointestinale. Infatti i PV 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 PV selvaggio, può trasmettere l'infezione ad altre persone: il PV selvaggio si moltiplica nell'intestino per poi essere eliminato con le feci [25].

Quindi il vaccino di Salk fornisce una protezione individuale contro i PV, 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.

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

L'OPV, detto anche vaccino di Sabin è costituito da una sospensione dei tre tipi di PV vivi e attenuati, ottenuti mediante rapidi passaggi in cellule epiteliali di rene di scimmia (linea cellulare Vero). Contiene anche neomicina e streptomicina in tracce. È 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 PV 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 PV in grado di riprodursi nel tratto intestinale ma non nel sistema nervoso centrale.

L'OPV è altamente efficace nel produrre immunità contro i PV: 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 PV selvaggi [26].

I PV 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 PV 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 [26].

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 PV selvaggi e ridurre la loro presenza nell'ambiente
- È 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) (Figura 8) [27].

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 poliomieliti da PV 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 [28].

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 controindicato e va sostituito con l'IPV sono i seguenti:

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

Inoltre, un problema legato all'uso di OPV è legato allo sviluppo di Poliovirus Vaccine Derive (VDPV) [29].

1.3.2.1. Polio-paralisi associata al vaccino (VAPP)

La VAPP è clinicamente indistinguibile dalla paralisi causata da PV selvaggi [27]. 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. 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.

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.

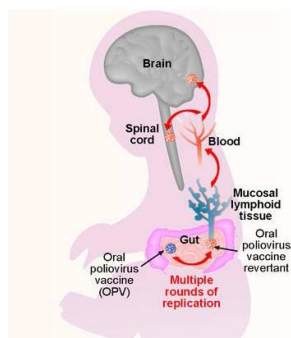


Figura 8 - Disseminazione dei ceppi vaccinali di PV retromutati nel SNC con conseguente insorgenza di VAPP (Fonte: immunopedia.org)

Il meccanismo che conduce allo sviluppo di questa forma di paralisi consiste in mutazioni o retromutazioni del PV 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 PV, 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 PV vaccinale vengano mutati a livello del determinante maggiore per la neurovirulenza nel sito d’entrata interno del ribosoma nella regione 5’-UTR. [27]

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 PV 3. Secondo alcuni studi di diversi decenni fa svolti in Ungheria, Stati Uniti e Germania orientale l’utilizzo del vaccino monovalente per il PV 3 (mOPV3) sembrava essere associato a un maggior rischio di sviluppare una VAPP rispetto agli altri vaccini. È degno di nota il fatto che nonostante il PV 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 [27].

1.3.2.2. Poliovirus di derivazione vaccinale (Vaccine-Derived PV - VDPV)

I virus vaccinali sono rari ceppi di PV originati dal ceppo presente nel vaccino orale (OPV) e mutati geneticamente [29]. 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 PV 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 PV derivati dal vaccino. Un ceppo è definito come vaccino derivato se almeno l’1% della sua composizione amminoacidica si distingue da quella della formulazione vaccinale.

Esistono tre tipi di PV derivati dal vaccino (Figura 10).

PV Vaccino-Derivati legati all'Immunodeficienza (Immunodeficiency-related Vaccine-Derived PV - iVDPV).

Sono PV di derivazione vaccinale derivanti 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 PV vaccino-derivati correlati all'immunodeficienza (iVDPVs) per periodi prolungati [30].

PV Vaccino-derivati Ambigui (Ambiguous Vaccine-Derived PV - aVDPV).

Sono PV di derivazione vaccinale che sono o isolati da persone senza immunodeficienza nota, o isolati dalle acque di scarico la cui ultima sorgente è sconosciuta.

PV Vaccino-Derivati Circolanti (Circulating Vaccine-Derived PV - 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 PV 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 PV selvaggio quelle da cVDPVs (www.polioeradication.org). I fattori chiave che favoriscono la comparsa e la diffusione di cVDPV sono gli stessi per la circolazione di PV 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. Gli episodi di circolazione di PV 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 PV selvaggi hanno paralizzato oltre 15.500 bambini [31]. Di particolare rilevanza però risulta il fatto che nel 2005 si sono verificati più casi da PV vaccinale che da PV selvaggio in seguito alla più grande epidemia registrata di cVDPV (1 gennaio 2005 -30 giugno 2009) rilevata in Nigeria [32]. Questa epidemia ha fornito l'opportunità di analizzare la patogenicità del virus, la gravità clinica della malattia e l'efficacia delle misure di controllo (Jenkins HE et al., 2010):

- Nessuna differenza significativa è stata riscontrata nella gravità clinica delle paralisi tra i casi cVDPV e i casi di PV 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.

Il tasso di attacco e la gravità della malattia associata con i recenti cVDPV2 individuati in Nigeria sono simili a quelli associati con PV selvaggi. Una pianificazione internazionale per la gestione del rischio di PV selvaggi, sia prima che dopo l'eliminazione, deve comprendere gli scenari in cui potrebbero emergere PV cVDPV altrettanto virulenti e patogeni.

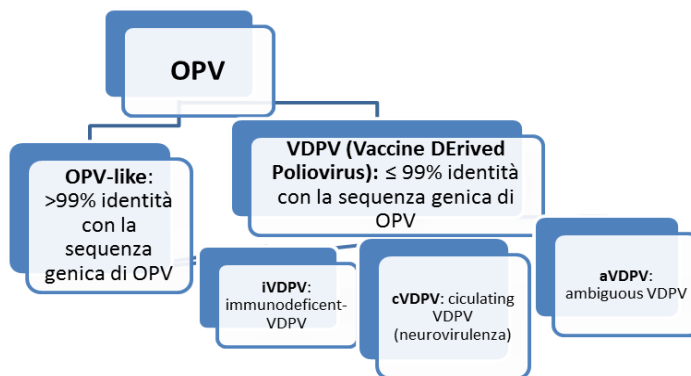


Fig. 10- Origine dei cosiddetti Poliovirus vaccinali (VDPV)

1.3.1. Vaccini orali vivi attenuati: monovalenti e bivalenti

La constatazione dell'eradicazione del PV di tipo 2 nel 2002 e dell'interferenza del virus vaccinicò 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 polio. Dal 2005 sono, infatti, disponibili i vaccini monovalenti vivi attenuati per i due tipi di PV 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 [33]. Dal 2009 allo stesso scopo viene utilizzato anche un vaccino bivalente vivo attenuato contro il tipo 1 (bOPV1) e il tipo 3 (bOPV3). La capacità delle formulazioni monovalenti e bivalenti di stimolare il sistema immunitario per altro si è mostrata al trivalente (Figura 9) [33].

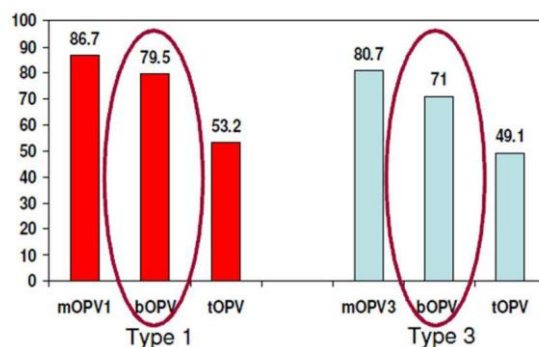


Figura 9 - Sieroconversione dopo due dosi di vaccino (Fonte: Lancet, 2010)

Secondo uno studio svolto da Sutter e colleghi la sierconversione 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 sierconversione è di circa l'80% per l'mOPV1 e il bOPV, e di circa il 50% per il vaccino trivalente [34]. La sierconversione 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 sierconversione per polio 2 nel trivalente è maggiore rispetto agli altri due sierotipi a qualsiasi dose. La sierconversione 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%) [34]

Sulla base dei risultati ottenuti in questo ed altri studi clinici di sierconversione 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 [35].

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 [35].

1.4. Progetto mondiale di eradicazione della poliomielite

L'attività di eradicazione ha lo scopo di eliminare perennemente 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, PV ha caratteristiche che lo rendono eradicabile [35]:

- 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 PV selvaggi. Il virus sopravvive nell'ambiente per un breve periodo
- esistono vaccini efficaci che conferiscono una protezione durevole nel tempo.

Gli obiettivi del GPEI sono:

1. Raggiungimento e mantenimento di immunizzazione di almeno l'80% della popolazione e completamento del ciclo di vaccinazione antipolio in tutti i bambini entro il primo anno di vita
2. Somministrazione di una dose extra OPV (*dose zero*) a tutti i bambini nati negli ospedali o che facevano ricorso a tali strutture subito dopo la nascita. La dose zero non doveva sostituire nessuna delle dosi prescritte

dalla normale schedula vaccinale che dovevano essere somministrate a 6, 10 e 14 settimane di vita

3. Accertamento della qualità dei vaccini prima della somministrazione. Per mantenere un buon livello qualitativo si doveva inoltre essere in grado di mantenere la catena del freddo
4. Introduzione di sistemi di sorveglianza e loro miglioramento laddove già esistessero: adozione di una definizione comune di caso, invio costante di rapporti anche in assenza di casi (Report Zero), investigazione dei casi segnalati e adozione di misure di controllo, raccolta ed analisi di campioni biologici per i casi segnalati
5. Potenziamento della rete dei laboratori che dovevano essere in grado di analizzare i campioni raccolti, di tipizzare i virus isolati e di discriminare tra PV selvaggi e vaccinali
6. Miglioramento dei mezzi per l'eradicazione: incremento delle coperture vaccinali, dei vaccini e dei test diagnostici affinché siano in grado di fornire velocemente la conferma di infezione [35].

Il progetto di eradicazione mondiale della poliomielite (GPEI=Global Polio Eradication Initiative) viene considerato il più grande progetto di salute pubblica mai esistito; un'enorme quantità di risorse economiche e umane sono state impiegate da organizzazioni internazionali e private: WHO, Unicef, WORLD BANK, Center of Disease Control and Prevention (CDC) and Rotary International, Bill&Melinda Gate Foundation and Rockefeller Foundation.

Le strategie che dovrebbero rendere possibile l'eradicazione della poliomielite sono fondamentalmente tre [35]:

1. Il mantenimento di alti livelli di immunizzazione della popolazione.

L'introduzione della vaccinazione di massa contro PV utilizzando il vaccino di Sabin prima e poi di Salk ha prodotto ottimi effetti nei Paesi industrializzati dove le condizioni igieniche già limitavano la circolazione del virus, abbattendo drasticamente l'incidenza di poliomielite. Non si può dire la stessa cosa per i Paesi in via di sviluppo;

si pensa che i bassi livelli di immunizzazione prodotti in questi Paesi siano dovuti a sindromi da malassorbimento, interferenze da parte di infezioni da altri virus enterici o ad una cattiva conservazione dei vaccini.

2. La programmazione di giornate di immunizzazione di massa attraverso i National Immunization Days (NIDs) e “mopping up”.

Nei primi anni '80 per cercare di troncane la trasmissione di PV selvaggio nei Paesi dove il virus era ancora endemico, sono state introdotte le “National Immunization Days”(NIDs) e le strategie di mopping-up (mop-up).

I NIDs sono operazioni speciali in cui in un solo giorno si somministra una dose di OPV a tutti i bambini sotto i 5 anni (indipendentemente dal loro stato vaccinale) presenti in una certa area, generalmente disagiata: ciò garantisce l'immunità ad intere Nazioni perché, i bambini mai vaccinati vengono immunizzati e nei bambini già vaccinati viene rafforzata l'immunità. L'intervento viene ripetuto dopo 2 settimane con una seconda dose di OPV. Inoltre, l'intera popolazione può ricevere indirettamente un richiamo vaccinale grazie all'eliminazione del PV vaccinale da parte dei bambini vaccinati. L'allestimento dell'operazione è tuttavia complesso: occorrono una catena del freddo funzionante, medici, volontari, sufficienti dosi di vaccino e fondi.

Dal 1998, durante i NIDs, vennero somministrate anche compresse di vitamina A per rinforzare il sistema immunitario e per proteggere da carenze nutrizionali che possono portare anche alla cecità.

Il mopping up è un intervento vaccinale di contenimento che si mette in atto al verificarsi di casi sospetti di poliomielite. Consiste nella somministrazione di due dosi di vaccino a tutti i bambini con meno di 5 anni nelle aree dove si sono individuati casi di infezione. Ciò incrementa l'efficacia dei NIDs e dei sistemi di sorveglianza. Generalmente viene effettuato in quei Paesi dove la circolazione di PV selvaggio indigeno è

ormai interrotta. Richiede che siano prontamente disponibili 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 [35].

3. La sorveglianza della paralisi flaccida acuta (PFA)

La sorveglianza della paralisi flaccida acuta (PFA) è il sistema di sorveglianza attiva e di riferimento mondiale per monitorare la circolazione di poliovirus (PV); consiste nell'individuazione precoce di tutte le possibili infezioni da PV nella popolazione in studio mediante l'analisi clinica e virologica di tutti i casi insorti di Paralisi Flaccida Acuta (PFA) nei minori di 15 anni d'età, essendola sintomatologia maggiormente rappresentata in caso di infezione da PV [35].

4. Altre attività di sorveglianza, quale quella ambientale (ES).

Il rationale della sorveglianza ambientale (ES) risiede nel fatto che individui infetti da EV, sintomatici o meno, eliminino grandi quantità di virus per periodi di tempo lunghi con le feci. Le feci di una popolazione vengono raccolte all'ingresso di un collettore fognario che serve quella data popolazione. Prelevando un campione di liquame e trattandolo attraverso idonei processi di concentrazione, è possibile identificare la presenza di EV e quindi di PV. La ES, sebbene non è un'attività istituzionale organizzata a livello mondiale come la sorveglianza delle PFA, sta diventando sempre più cruciale nel programma di eradicazione di PV e viene consigliata da OMS per tutti quei Paesi che usano esclusivamente IPV e nei quali i livelli di immunizzazione siano buoni. Infatti, in queste popolazioni, il PV selvaggio introdotto potrebbe circolare ampiamente tra gli individui prima che il primo caso clinico si manifesti [35].

1.5. Copertura vaccinale mediante la vaccinazione di routine

Per il raggiungimento dell'obiettivo di eradicazione è necessario mantenere in tutti i Paesi elevate coperture vaccinali. 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 [36]; 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 [37]. 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 [38].

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 PV selvaggio dagli USA in meno di vent'anni ed analogamente da altri Paesi industrializzati. 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 PV (selvaggi o vaccino-derivati) ed eventualmente provocare anche la comparsa, a causa di mutazioni, di

stipiti 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.

1.5.1. Il calendario vaccinale anti-polio in Italia

Il calendario vaccinale anti-polio in Italia è cambiato più volte per far fronte alle esigenze epidemiologiche che si presentavano nel tempo:

- ❖ Nel 1959, in seguito alla più grande epidemia di Polio conosciuta nel nostro Paese (1958), viene introdotta la vaccinazione IPV (4 dosi)
- ❖ Nel 1964, non avendo ottenuto i risultati sperati si decide di vaccinare obbligatoriamente tutti i nuovi nati con OPV (4 dosi)
- ❖ Nel 1999 si opta per la vaccinazione mista IPV-OPV (prime due dosi con vaccino di Salk e le ultime due con vaccino di Sabin)

Attualmente è in vigore la schedula “Tutto IPV” trivalente (Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana, 13/07/2002), così organizzata (Fig.11):

- prima dose: 3° mese;
- seconda dose: 5° mese;
- terza dose: 11°-12° mese;
- quarta dose: 6° anno di vita.

Calendario vaccinale per la vita 2014 (Siti, SIP, FIMP, FIMMG)

Vaccino	0 gg/30' gg	3° mese	4° mese	5° mese	6° mese	7° mese	11° mese	13° mese	15° mese	6° anno	12°-18° anno	19-49 anni	50-64 anni	>64 anni
DTPa		DTPa IPV		DTPa IPV			DTPa IPV			DTPa** IPV	dTpaIPV	1 dose di dTpa*** ogni 10 anni		
Epatite B	EpB-EpB*	EpB		EpB*			EpB					3 dosi: pre-esposizione (0, 1, 6 mesi) 4 dosi: post-esposizione (0, 2, 6 sett. + booster a 1 anno) o pre-esposizione imminente (0, 1, 2, 12)		
Hib		Hib		Hib			Hib							
Pneumococco		PCV13		PCV13			PCV13		PCV13**		PCV13/PPV23 (vedi note)			PCV13
MPRV							MPRV			MPRV				
MPR							MPR			oppure MPR + V	MPR oppure MPR + V*			
Varicella									V	Y	Y*	2 dosi MPR*** + V* (0-4/8 settimane)		
Meningococco C							Men C o MenACWY coniugato	Men C o MenACWY coniugato				MenACWY [†] coniugato 1 dose		
Meningococco B		Men B	Men B		Men B		Men B	Men B						
HPV												HPV [†] : 2-3 dosi (in funzione di età e vaccino) fino a età massima in scheda tecnica		
Influenza							Influenza**				1 dose all'anno		1 dose all'anno	
Herpes Zoster														1 dose [†]
Rotavirus		Rotavirus ^{††}												
Epatite A									EPA ^{†††}		EPA ^{†††}	2 dosi (0-6-12 mesi)		

Fig.11. Calendario vaccinale attivo in Italia

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.

La Commissione Nazionale Vaccini, un organo consultivo-propositivo del Ministero della Salute, considera inoltre necessario le seguenti azioni:

- 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 PV 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 [39].

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 [39].

1.5.2. Livelli immunitari di anticorpi antipolio in Italia.

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 PV per circa il 98% della popolazione italiana [40]. 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 PV 1, il 25.64% di soggetti non protetti verso PV 2 ed il 32.05% di soggetti non protetti verso PV 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 PV fosse introdotto nel Paese, soprattutto alla luce dei fatti occorsi nel 2010 in Tajikistan [41] .

Nello studio del 2007/08 si notò un decremento del livello nazionale dei titoli anticorpali protettivi rispetto agli stessi dati registrati nel 2000/01 [42]:

- +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

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.

1.6. Traguardi nella lotta all'eradicazione della polio

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, al 2010 ed oggi al 2018 [35].

- **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.

- **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.
- **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".
- **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. 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.
- **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.

- **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". 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.
- **2002:** il 21 giugno la **Regione Europea**, costituita da 53 Paesi (circa 873 milioni di abitanti), venne certificata "polio-free" (Tabella VII). 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.

- **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 PV 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).
- **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
- **2008:** redatto 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:** 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).
- **2014:** La **Regione del Sud Est Asiatico** viene dichiarata polio-free; solamente tre Paesi rimangono endemici per la Polio.
- **2015:** La circolazione di PV è stata la più bassa mai registrata, con solamente 56 casi di epidemie di virus selvaggio dai due paesi rimasti ancora endemici: Pakistan e Afghanistan.

1.7. Recenti epidemie di Polio

1.7.1. Epidemia in Tagikistan

Particolarmente degna di nota è l'epidemia del Tagikistan del 2010 che segna la prima importazione di PV 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 PV selvaggio nella Regione Europea e il sequenziamento virale ha stabilito che il virus responsabile è un PV selvaggio Tipo-1 geneticamente più vicino a un ceppo isolato in Uttar Pradesh, India, Paese allora endemico. 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 PV [41]; il ritardo nella messa in atto di interventi vaccinali straordinari, ha permesso che la circolazione del PV 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 12).

Dei 457 casi in Tagikistan confermati in laboratorio essere causati da PV selvaggio, la maggior parte (più di 220 casi – circa il 49%) erano bambini tra 1 e 5 anni. Il numero totale dei casi include anche 29 decessi (6.3%), di cui 4 erano bambini di età inferiore a 1 anno, 12 erano bambini tra 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 [41]. 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 PV selvaggio. Nel 2010 i casi di paralisi flaccida acuta indagati sono stati [41]:

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

L'epidemia è stata inoltre controllata grazie alle attività di immunizzazione supplementare (SIAs) mediante l'utilizzo del vaccino monovalente per il PV 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). 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. Per coprire eventuali gap immunitari rimasti e per prevenire l'eventuale trasmissione di PV 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 [43]. 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 PV 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 [44]. 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 PV selvaggio [43].

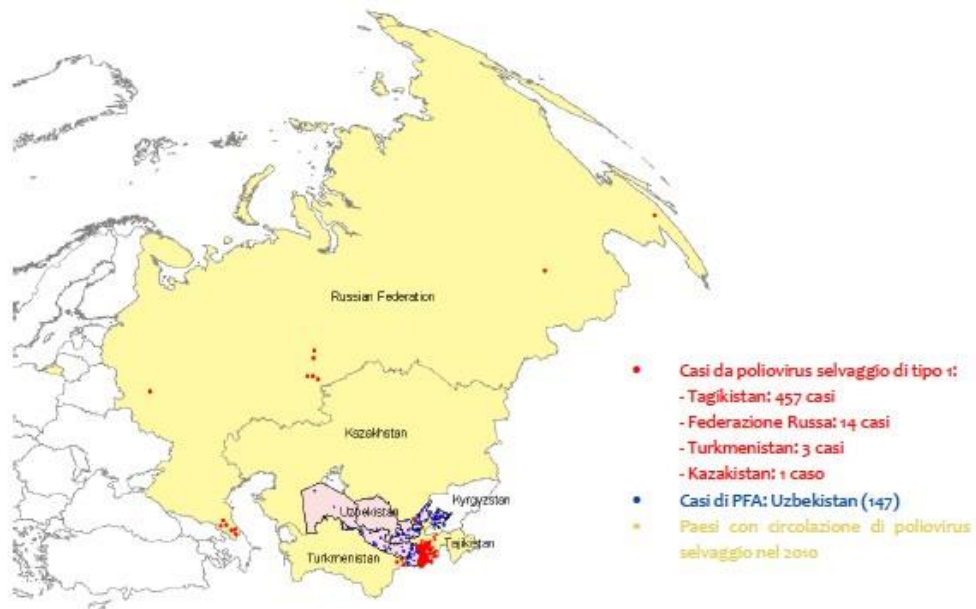


Figura 12 - Distribuzione dei casi di PV selvaggio nella Regione Europea nel 2010 e dei casi di paralisi flaccida acuta in Uzbekistan (Fonte: OMS)

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

1.7.2. *Epidemia in Siria*

L'11 novembre 2013 l'OMS aveva riferito di 13 casi confermati di polio causati da PV selvaggio e altri ceppi molto simili a questo erano stati ritrovati anche in campioni ambientali in Israele, Cisgiordania e Striscia di Gaza a partire dal febbraio 2013. Questa epidemia di PV è stata causata dalla drammatica diminuzione della copertura vaccinale è durante la guerra civile che si stava svolgendo tra quelle popolazioni. In seguito a questo ritrovamento e all'enorme quota di Siriani in fuga dalla loro terra e diretti in varie parti d'Europa, il 5 maggio del 2014 l'OMS aveva dichiarato lo stato di Emergenza di Sanità Pubblica Internazionale, una situazione che non accadeva dalla pandemia influenzale H1N1 del 2009 [45] e si era raccomandato che agli Stati membri dell'UE / SEE:

- ✓ la verifica delle coperture vaccinali nazionali e nel caso di coperture vaccinali nazionali inferiori al 90% l'aumento degli sforzi volti per migliorare la copertura vaccinale con la pianificazione nazionale;
- ✓ l'identificazione delle fasce di popolazione a rischio;
- ✓ la necessità di predisporre piani operativi e di emergenza per la somministrazione del vaccino antipolio in caso di evidenza di trasmissione di virus;
- ✓ il rafforzamento della sorveglianza sia ambientale che clinica, in quanto, data l'attuale qualità - non ottimale - dei sistemi di sorveglianza europea per la polio, c'è la preoccupazione che aumentino le probabilità che la circolazione del WPV non venga prontamente rilevata;
- ✓ la necessità di concordare a livello UE standard e indicatori di performance.

Fortunatamente, l'intervento tempestivo delle campagne vaccinali e delle giornate NIDs e Mop-up hanno permesso di interrompere rapidamente la

circolazione di PV nella Regione medio-orientale e nessuna importazione di PV è stata registrata in Paesi precedentemente polio-free [35].

2. Protocolli, Materiali e Metodi

2.1. La sorveglianza delle PFA

La sorveglianza della paralisi flaccida acuta (PFA) è il sistema di sorveglianza attivo e di riferimento mondiale per monitorare la circolazione di poliovirus (PV); consiste nell'individuazione precoce di tutte le possibili infezioni da PV nella popolazione in studio mediante l'analisi clinica e virologica di tutti i casi insorti di Paralisi Flaccida Acuta (PFA) nei minori di 15 anni d'età, essendo la sintomatologia maggiormente rappresentata in caso di infezione da PV. È importante sottolineare che sotto la definizione sintomatica di PFA sono comprese: la poliomielite paralitica, la sindrome di Guillain-Barré (GBS), la mielite trasversa, la poliradiculoneurite, la neurite traumatica e quella neoplastica, ed è quindi importante distinguere se i casi siano riconducibili a infezione da PV tramite isolamento e identificazione del virus, per poter stabilire l'incidenza della poliomielite rispetto a malattie simili (All.1). Tutti questi casi sono obbligatori di notifica ed analisi virologica. In tale contesto, dovranno rientrare all'interno della rete di sorveglianza tutti i casi di PFA di qualsiasi natura in bambini <15 anni ed ogni caso di sospetta infezione da PV in persone di tutte le età. La sorveglianza delle PFA è un sistema con una bassa specificità ed un'alta sensibilità, quindi il miglior sistema per il controllo di agenti biologici poco circolanti nella popolazione. Essendo il sistema di sorveglianza di riferimento mondiale, dovrà essere svolta utilizzando protocolli standardizzati e la bontà dell'attività verrà costantemente valutata attraverso numerosi indicatori di performance.

Brevemente, i criteri OMS per valutare l'efficienza della sorveglianza delle PFA sono [35]:

- **INCIDENZA DELLE PFA** (Incident Index). In base all'esperienza accumulata durante il processo di eradicazione della poliomielite nel continente americano, si è stabilito che, anche in assenza di malattia, la frequenza di casi di PFA è di almeno 1:100.000 soggetti di età inferiore a

15 anni. Ogni realtà territoriale quindi avrà un proprio numero di casi attesi/anno. L'incidenza avrà un valore compreso tra 0 ed 1.

- **ADEGUATEZZA DEI CAMPIONI BIOLOGICI E DELLE ANALISI VIROLOGICHE.** Per almeno l'80% dei casi di PFA notificati, dovranno essere prelevati 2 campioni fecali, collezionati a distanza di 24-48 ore l'uno dall'altro ed entro 14 giorni dall'insorgenza della paralisi. Il rationale di prelevare due campioni a distanza di tempo risiede nel fatto che i PV come tutti gli EV vengono eliminati dall'ospite in maniera intermittente. I campioni biologici raccolti dovranno essere esaminati al più presto da un laboratorio accreditato dall'OMS e le indagini virologiche dovranno essere concluse entro 28 giorni dal ricevimento dei campioni.
- **ADEGUATEZZA DEL SISTEMA DI SORVEGLIANZA.** Questo criterio considera contemporaneamente il numero e l'adeguatezza dei casi. Consiste in un valore compreso tra 0 ed 1 ottenuto dal prodotto tra il valore di incidenza e la percentuale di casi di PFA con adeguati campioni virologici fecali raccolti.
- **ADEGUATEZZA DELL'ANALISI CLINICA.** Per tutti i casi osservati dovranno essere forniti dati relativi al follow-up clinico a 60-90 giorni dall'insorgenza della paralisi, per escludere eventuali paralisi residue che potrebbero far sospettare per la presenza di poliomielite paralitica.
- **ADEGUATEZZA EPIDEMIOLOGICA.** Secondo studi epidemiologici mondiali, la percentuale di EVNP isolati durante la sorveglianza delle PFA dovrebbe attestarsi attorno al 10% del totale dei casi esaminati.

2.1.1. Organizzazione della sorveglianza delle PFA in Italia ed in Lombardia

A partire dal 1997, in Lombardia è stata organizzata una rete di sorveglianza regionale, attraverso l'arruolamento di numerosi ospedali sentinella distribuiti in maniera omogenea sul territorio ed operanti su base volontaria ed oggi ancora in corso. Gli Ospedali scelti sono di medie-grandi dimensioni ed hanno almeno un reparto di Pediatria e Neurologia [46]. Per ogni struttura è poi stato richiesto il nominativo di uno o più medici con il ruolo di referenti ospedalieri. Per poter meglio partecipare alla rete e comprendere fino in fondo il razionale della sorveglianza PFA, il CRR: i) spedisce periodici report con i risultati dell'attività, ii) notifica eventuali criticità nel funzionamento della rete e, iii) invia 'Alert' epidemiologici e vari approfondimenti relativi al 'Polio Eradication Initiative' ai referenti e alle direzioni sanitarie dell'Ospedale sentinella.

I referenti ospedalieri invece si impegnano ad inviare al CRR il "Report Zero Casi" ogni 15 giorni (All.2). Laddove un caso di PFA fosse registrato, il referente ospedaliero dovrà: i) compilare e inviare al CRR, al Ministero della Salute e all'ISS il "modulo di segnalazione iniziale" (All.3), che raccoglie i dati demografici e clinici del caso permettendone un inquadramento diagnostico. Se presente verrà fornita la diagnosi iniziale differenziale; ii) raccogliere e inviare correttamente al CRR i campioni biologici accompagnati dal "Modulo per la conferma dei prelievi" (All.4) nel quale verranno fornite le date relative al prelievo. I campioni biologici del caso consistono in 2 campioni di feci raccolti entro 14 giorni dall'inizio della sintomatologia e a distanza di 24-48h l'uno dall'altro, un campione di siero raccolto in fase acuta e uno a distanza di 15-20 giorni (fase convalescente) ed eventualmente altri campioni clinici ritenuti utili. Per tutti i campioni biologici dovrà essere garantita la catena del freddo iii) compilare e inviare il "Modulo per il follow-up a 60-90 giorni" (All.5) nel quale verrà indicata la diagnosi conclusiva differenziale se presente ma, soprattutto, si andranno a valutare eventuali paralisi residue.

I laboratori CRR accreditati svolgono le indagini virologiche preliminari, atte a: i) trattare i campioni virologici nella fase pre-analitica, ii) ricercare la presenza di PV ed EVNP mediante tecniche di biologia cellulare e molecolare, iii) sierotipizzare PV eventualmente isolati. I risultati ottenuti dai CRR vengono poi confermati dall'ISS. L'ISS, in qualità di laboratorio Nazionale OMS, svolge inoltre la caratterizzazione intra-tipica dei PV eventualmente isolati e ne opera il sequenziamento genomico per indagare la natura del virus (selvaggio, Sabin-Like, vaccino derivato). Inoltre, vengono tipizzati anche gli EVNP circolanti. Parallelamente il Ministero della Salute raccoglie i dati clinici, virologici ed epidemiologici riguardanti i casi PFA i quali verranno inoltrati all'OMS attraverso il portale informatico PolioLabNet. Qui vengono raccolti dati da tutti i Paesi, elaborati e resi visibili sul portale CISID accessibile anche ai cittadini oltre che agli operatori sanitari [46].

L'organizzazione della rete PFA in Lombardia nel contesto mondiale è mostrata in Figura 14.

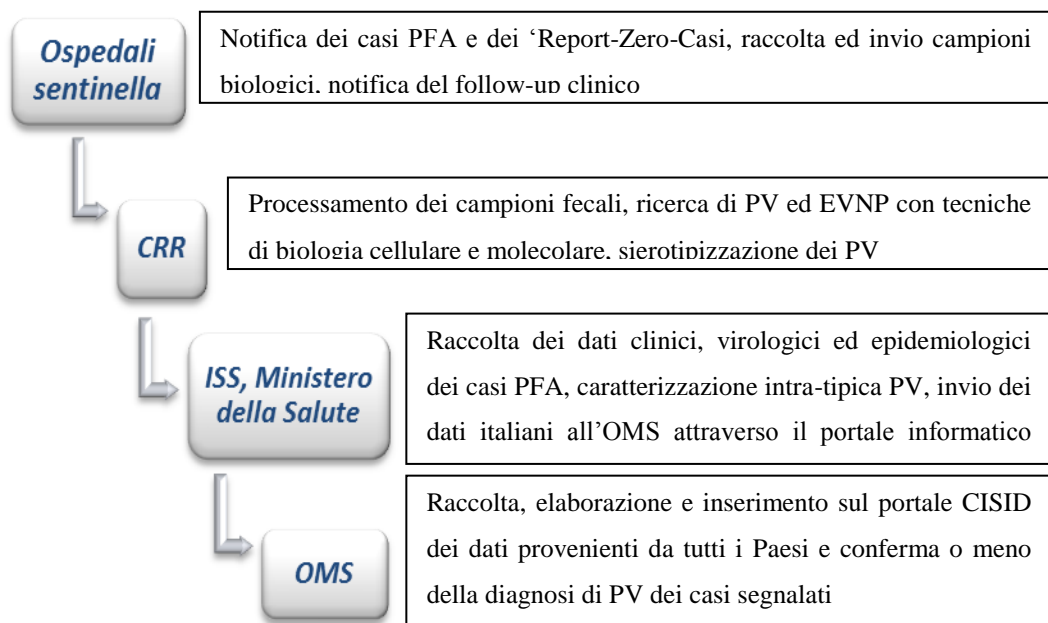


Fig. 14 Organigramma del sistema di sorveglianza delle PFA

2.1.2. Raccolta e processamento dei campioni biologici per caso di PFA

Poiché PV si moltiplica nel tratto intestinale, i campioni fecali sono i più adatti per l'isolamento del virus. I tamponi faringei sono meno utili dal momento che PV persiste nell'orofaringe solo 7-10 giorni dall'insorgenza della malattia ed a bassi titoli. Sono richiesti inoltre campioni sierologici (siero/plasma) raccolti in fase acuta e nella fase convalescente (a distanza di 15 giorni) per poter svolgere indagini sierologiche con lo scopo di individuare eventuali sier conversionsi attraverso l'esecuzione del test per la titolazione degli anticorpi neutralizzanti anti-poliovirus [35; 46].

FECI E TAMPONI RETTALI. I campioni fecali dei casi di PFA devono essere raccolti entro 14 giorni dall'insorgenza dei primi sintomi. Poiché l'eliminazione del virus è intermittente, per migliorare la possibilità di isolare il virus, è necessario raccogliere due campioni consecutivi a distanza di 24-48h uno dall'altro. Nei protocolli OMS viene raccomandato il trattamento al cloroformio per i campioni fecali data la resistenza dei PV ed EVNP ad esso; oltre a rimuovere batteri e funghi, elimina i possibili lipidi tossici e permette la dissociazione di aggregati virali.

SIERO/PLASMA. I campioni sierologici e plasmatici si ottengono come risultato di una centrifugazione a circa 2,000 rpm per 10 minuti rispettivamente da sangue intero e sangue intero con anticoagulante aggiunto.

ALTRI CAMPIONI BIOLOGICI. Oltre ai campioni fecali e sierici, tamponi faringei e liquido cefalorachidiano possono essere utilizzati per la diagnosi di infezione di poliovirus. Il tampone faringeo deve essere raccolto il prima ed entro 15 giorni dall'esordio della malattia mentre il liquor dovrebbe essere raccolto entro due giorni dall'esordio.

2.2. *La sorveglianza ambientale*

Oltre alla sorveglianza delle PFA i protocolli OMS prevedono la sorveglianza ambientale (ES) di PV in campioni di acque reflue prelevate all'ingresso di depuratori fognari come attività complementare. Il razionale della ES risiede nel fatto che i soggetti infettati da PV, anche se asintomatici, eliminano notevoli quantità di virus nell'ambiente per periodi di tempo variabili ma comunque lunghi; quindi, analizzare periodicamente campioni di liquame consente l'individuazione di PV eventualmente presenti [47].

La ES è particolarmente utile nei Paesi polio-free in cui si vaccina con IPV. Difatti, se un PV fosse introdotto nel territorio, andrebbe ad infettare gli individui che immunizzati con IPV non si ammalerebbero e non manifesterebbero PFA, ma che continuerebbero ad eliminare PV con le feci non avendo immunità mucosale specifica verso PV. I PV eliminati continuerebbero a replicare nel tratto gastroenterico degli individui fin tanto che potrebbero incontrare soggetti non immunizzati o immunodeficienti. Inoltre ad ogni passaggio il PV potrebbe mutare o ricombinarsi con altri EVNP, creando situazioni potenzialmente molto pericolose per la Sanità Pubblica.

Per questi motivi, il sistema di ES dà garanzia di attendibilità ed efficienza se durante le indagini condotte sulle matrici ambientali viene indagata anche la presenza di EVNP. Il ritrovamento di EVNP nei liquami non conferma semplicemente la qualità delle indagini svolte, ma rappresenta uno degli obiettivi della sorveglianza stessa: una eventuale co-circolazione di VDPV ed EVNP soprattutto 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 PV selvaggio [47].

I criteri OMS di valutazione di efficienza per la sorveglianza ambientale sono: 1) rilevazione di EVNP in almeno il 30% dei campioni ambientali; 2) individuazione di ceppi Sabin-like, specialmente dopo e durante i NIDs o altre

campagne vaccinali, in campioni appartenenti a popolazioni immunizzate con OPV [35].

2.2.1. Organizzazione della Sorveglianza ambientale in Italia e in Lombardia

La ES di PV e di altri EV è iniziata in Italia nel 2005 come studio pilota che mirava a verificare la sensibilità e la fattibilità del progetto ed il rispetto dei criteri stabiliti dall'OMS. Dal 2006 la sorveglianza ambientale è stata estesa a nove città selezionate in base all'alto tasso di immigrazione presente in esse ed oggi è attiva in 6 città (Milano, Parma, Bari, Palermo, Sassari, Bolzano) [48].

La ES in Lombardia viene svolta dal 2006 presso il CCR dell'Università degli Studi, già attivo nella sorveglianza delle PFA.

Per le finalità di questo studio la scelta dei depuratori si è basata principalmente sulla numerosità della popolazione afferente, 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 che comprenda tra 100.000 e 300.000 abitanti.

La rete di raccolta delle acque reflue milanesi attraversa la città da nord a sud (fig. 15), 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 dall'estrema periferia est della città, circa il 15% del territorio, oltre a quelle provenienti da altre località della provincia di Milano, 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 [48].



Fig.15. Localizzazione dei depuratori di Milano. Nosedo e Peschiera Borromeo sono stati quelli in studio. Fonte: ARPA Lombardia

2.2.2. Campionamento e trattamento dei reflui ambientali

Il campione ambientale è rappresentato dal refluo fognario prelevato all'ingresso del depuratore, dove tutte le acque di scarico vengono raccolte in un unico collettore. Il prelievo è il risultato del campionamento medio bilanciato svolto nella 24 ore, per evitare alterazioni della concentrazione di materia organica del campione stesso. Vengono prelevate due bottiglie di liquame del volume di 500 mL; un'aliquota viene conservata tal quale a -80°C , mentre l'altra viene processata. In base ai criteri OMS [49] di numerosità della popolazione in studio, tutti i campionamenti sono stati effettuati con periodicità quindicinale.

Per il trattamento dei liquami le linee guida dell'OMS prevedono il metodo di concentrazione mediante separazione bifasica. I concentrati sono pronti per essere in parte raccolti in aliquote e conservati a -80°C , in parte utilizzati per la semina su colture cellulari RD (cellule di Rhabdomyosarcoma umano) ed L20B

(cellule di topo ingegnerizzate esprimenti il recettore di PV umano). Tali colture cellulari sono state fornite a tutti i laboratori coinvolti nella rete di sorveglianza di PV dall'ISS e provenienti dall'American Type Culture Collection (ATCC – cell line colture, USA) [49]. Tutte le fasi manuali di lavorazione dei campioni vengono effettuate sotto cappa biologica a flusso laminare, sia per preservare la sicurezza dell'operatore, sia per evitare le contaminazioni crociate possibili fra campioni diversi in seguito alla formazione di aerosol.

Per questo progetto di dottorato sono stati raccolti dal 2012 al 2015, 273 campioni ambientali distribuiti per depuratore e per anno in studio come mostrato in Tabella 1:

Tabella 1: distribuzione spaziale e temporale dei campioni di liquami analizzati

	2012	2013	2014	2015*	Totale
Peschiera	26	24	24	14	88
Nosedo	17	24	24	23	88
Nosedo ampl EST	17	24	24	23	88
Totale	60	72	72	69	273

* gennaio-ottobre

2.3. Protocolli in uso per la rilevazione di PV ed EVNP

2.3.1. Isolamento in coltura cellulare

Il metodo di riferimento per la ricerca degli EV è l'isolamento in coltura cellulare. Nell'ambito della sorveglianza della PFA, l'OMS consiglia l'utilizzo di tre linee cellulari [49]:

- 1) RD (Human Embryonic Rhabdomyosarcoma) cellule umane tumorali di Rhabdomyosarcoma suscettibili per Echovirus e Coxsackie A, tranne A1, A19 e A22

- 2) Hep-2C (Human Larinx Epidermoid Carcinoma) cellule umane tumorali di carcinoma laringeo, permissive per i Coxsackie B
- 3) L20B (murine L cells) cellule transgeniche di topo che esprimono il recettore umano per PV, permettono la crescita dei soli PV e servono per l'immediato riconoscimento della presenza del medesimo virus.

L'uso combinato di queste linee cellulari fornisce grande specificità nel rilevamento dei PV grazie alle L20B e, grazie alle RD, un elevato livello di sensibilità nell'individuare PV e molti altri EVNP come garanzia del funzionamento della metodica. La selezione di poche linee cellulari per la diagnosi di laboratorio di poliomielite permette la standardizzazione delle tecniche e la possibilità di confronto dei risultati.

La semina del campione in fiasche da 25 cm² (1.100.000 cellule/fiasca), contenenti cellule L20B oppure cellule RD, viene effettuata rispettando le linee guida dell'OMS [49]. Brevemente, dopo aver verificato l'opportuna crescita in coltura, viene 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-streptomicina e 0.1% di Fungizone (LIFE TECHNOLOGIES, USA). Per ogni campione ambientale viene inoculata 1 fiasca di RD, 1 fiasca L20b mentre per i casi PFA vengono allestiti colture in piastra a 12 pozzetti (400.000 cellule/pozzetto). Il volume dei campioni inoculati sarà pari al 10% del volume del mezzo in cui sono poste le cellule. Dopo l'inoculo, le fiasche e le piastre sono mantenuta a 37°C in un incubatore al 5% di CO₂ ed osservate al microscopio ottico quotidianamente per i 7 giorni successivi, facendo attenzione all'eventuale comparsa di Effetto Cito Patico (CPE). Alla comparsa del CPE oppure al termine dei 7 giorni, viene effettuato un passaggio in cieco trasferendo 0,2 ml del surnatante di ciascuna un pozzetto delle piastra a 12 pozzetti contenenti cellule dello stesso tipo e si procederà la lettura quotidianamente per 7 giorni. Questo ulteriore passaggio serve per prolungare il tempo di osservazione ed aumentare la sensibilità dell'isolamento [49]. E' risaputo che l'isolamento su L20B 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 L20B, aumentando così la probabilità di isolamento. L'effetto citopatico da EV 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.

L'estensione del CPE viene valutata secondo una scala di 4 gradi (Figura 16) a seconda che sia interessato il 25% del monostrato (Grado-1), il 50% (Grado-2), il 75% (Grado-3) e tutto il monostrato (Grado-4):

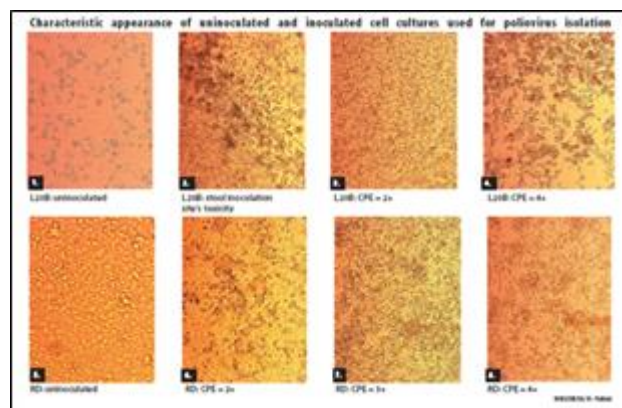


Fig. 16. Aspetto dell'effetto citopatico (CPE) in coltura cellulare ai diversi gradi

2.3.2. Test di tipizzazione sierologica di PV isolati

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 tipizzazione sierologica dei PV isolati. I campioni positivi per PV devono essere inviati all'ISS per la conferma del risultato e per l'eventuale caratterizzazione molecolare dei virus. Il test di neutralizzazione del CPE prevede l'allestimento di una piastra a 96 pozzetti (BIOSIGMA S.R.L, ITALY) (Figura 17). In ogni

pozzetto, ad eccezione di quelli dedicati al controllo negativo e al controllo positivo, si depositano 50 μL di EMEM, 25 μL di antisiero contenete anticorpi neutralizzanti specifici e 25 μL dell'isolato da caratterizzare, precedentemente titolato in modo da contenere 100 TCID₅₀. In ogni piastra vengono allestiti un controllo cellule un controllo virus contenente Dopo 1h 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 alla comparsa dell'effetto citopatico nei pozzetti dedicati al controllo positivo. Il sierotipo del PV viene identificato in base alla comparsa o meno del CPE dopo reazione con gli antisieri specifici [49].

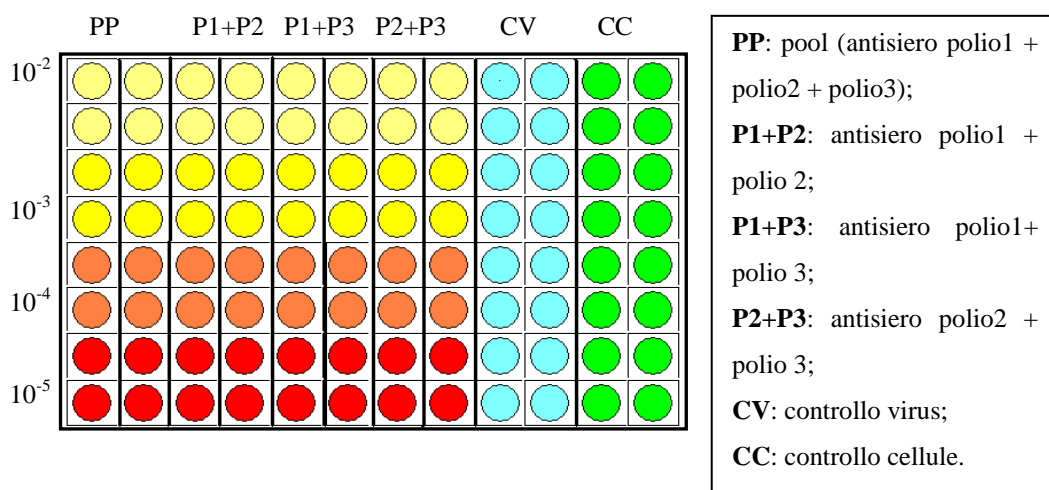


Fig 17: Tipizzazione dei poliovirus; rappresentazione schematica dell'inoculo in micropiastra.

2.3.3. Titolazione degli anticorpi neutralizzanti PV

Sui campioni di siero dei casi di PFA segnalati si esegue la titolazione degli anticorpi anti-PV con la tecnica di neutralizzazione in micropiastra. L'immunità verso il PV è misurata attraverso la determinazione della capacità del siero di neutralizzare l'infettività di ciascuno dei tre tipi di PV in colture cellulari L20B. Una dose virale standard 100TCID₅₀ (Tissue Culture Infectious

Dose 50) di collezione e proveniente dall'ISS (Ceppi Sabin-like) è incubata con diluizioni di siero da 1:4 a 1:2,046.

Il test viene eseguito su 4 piastre da 96 pozzetti: 3 per i sierotipi (piastra PV1, piastra PV2, piastra PV3) e 1 per il controllo positivo e la back titration. La back titration, o metodo della diluizione limite (metodo di Reed-Muench) è una tecnica che consiste nel seminare in coltura cellulare virus a diluizioni seriali in base dieci, osservare la comparsa del CPE e stabilire attraverso il calcolo di Reed-Muench le effettive 100TCID₅₀ virali da utilizzare nella seduta

Su ciascuna delle piastre PV1, PV2 e PV3 vengono allestiti pozzetti contenenti 50 µl di EMEM, 50 µl di siero scomplementato a diverse concentrazioni 50 µl di 100TCID₅₀ di virus. Dopo 1h di incubazione a 37°C vengono aggiunte le cellule. Sulle piastre è sempre presente anche un Controllo Cellule (100 µl di EMEM) e un Siero Standard (ST) a titolo noto, di collezione e proveniente dall'ISS. Viene inoltre allestito un Controllo di Tossicità (CT) per accertarsi che l'effetto citopatico/citotossico eventualmente visibile in cellula non sia dovuto a contaminazione ad esempio da funghi o batteri. Una volta avvenuta la reazione virus-anticorpo, vengono aggiunte le cellule e le piastre vengono messe in incubatore a 37°C per alcuni giorni. La lettura delle cellule si esegue quotidianamente. La presenza di un marcato effetto citopatico evidenzia che il PV non è stato neutralizzato perché il siero non contiene anticorpi specifici; invece l'assenza del CPE indica che il PV è stato neutralizzato dagli anticorpi specifici contro il PV presenti nel siero analizzato.

Il titolo degli anticorpi neutralizzanti può essere calcolato come reciproco della ultima diluizione neutralizzante o come end-point applicando la formula di Karber [49]. 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.

2.4. Identificazione e caratterizzazione degli EV

Per una rapida identificazione della presenza di EV, tutti i campioni delle PFA, ed i campioni ambientali positivi che manifestassero CPE in RD erano testati da n-PCR con i seguenti primers: PVM1-1 [5'CAA GCA CTT CTG TTT CCC C 3'] and PVM1-2 [5'ATT GTC ACC ATA AGC AGC CA3']) specific for the 5' non-coding region [5'NCR] (nucleotide [nt] 179) comuni a tutti gli EV umani [51]. I campioni risultati positivi per EV erano successivamente caratterizzati attraverso sequenziamento genico svolto da Macrogen (Korea), usando i seguenti primers: AN88 (5'TAC TGG ACC ACC TGG NGG NAY RWA CAT3') e AN89 (5'CCA GCA CTG ACA GCA GYN GAR AYN GG3') [50]. Tali tecniche sono state utilizzate sia per le indagini sui campioni dei casi di PFA sia su quelli ambientali e precedentemente presentate

2.4.1. Analisi statistica

L'analisi statistica è stata generata utilizzando il programma informatico OpenEpi attraverso il test Chi-quadro di Pearson per il confronto tra i risultati ottenuti nei diversi anni e tra i diversi depuratori. E' stato considerato un livello di confidenza del 95% per cui una serie di dati viene ritenuta statisticamente significativa se il suo p-value è minore o uguale a 0.05 ($p < .05$).

3. Risultati

3.1. Sorveglianza delle PFA dal 2012 al 2015

Nella rete di sorveglianza della PFA sono stati arruolati 50 ospedali/presidi di portata medio-grande siti nel territorio Lombardo con almeno uno tra i reparti di: i) pediatria, ii) neurologia pediatrica, iii) neuropsichiatria infantile e iv) terapia intensiva o rianimazione. Il 32% (16/50) delle strutture era sita nella provincia di Milano, come mostrato in Fig. 18

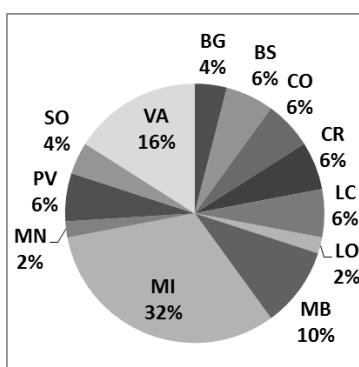


Fig. 18. Distribuzione degli enti aderenti alla rete PFA per provincia Lombarda, 2012-2015* (*gennaio-ottobre).

Il numero dei casi di PFA segnalati dal 2012 al 2015 e gli indici di performance dell'attività di sorveglianza richiesti da OMS e raggiunti sono mostrati in tabella 2. Considerando l'intero periodo di studio, sono stati segnalati 52 casi di PFA, su un atteso di 50, per la popolazione inferiore ai 15 anni d'età in Lombardia (età media: 5.8 anni; IQR: 10 anni; 54% maschi), raggiungendo un 'Incident Index' pari a 1.04 (52/50) contro un valore atteso di almeno 1.

Dei 52 casi di PFA segnalati, per 37 (71.2%) è stato possibile raccogliere ed analizzare virologicamente due campioni fecali prelevati a distanza di 24 ore uno dall'altro ed entro i 15 giorni dall'esordio dei sintomi della paralisi raggiungendo un punteggio di 'Surveillance Index' (calcolata come 'percentuale casi di PFA con idonei campioni fecali x Incident Index) pari a 0.71 contro un punteggio richiesto di 1. La notifica relativa al follow-up diagnostico a 60-90

giorni dall'esordio della paralisi è pervenuta per l'82.2% (37/52) dei casi dal 2012 al 2014, raggiungendo i criteri di adeguatezza OMS che richiedono il follow-up diagnostico per almeno l'80% delle notifiche. La stima della quota dei casi con follow-up per il 2015 non è stata possibile in quanto la maggior parte di questi è attesa nel periodo successivo alla stesura di questa tesi. (Tabella 2).

Complessivamente, 6 casi di PFA (11.5%) sono risultati positivi alla presenza di EVNP contro il valore atteso di almeno il 10% dichiarato da OMS (Tabella 2). E' stato possibile genotipizzare 3 dei 6 NPEV isolati: 1 Echo 6 e 2 Echo11. Nessun PV selvaggio è stato isolato nel corso della sorveglianza ma è stato possibile identificare nel 2014 la presenza di PV-Sabin Like Tipo-3 in un caso di poliomielite paralitica associata a vaccino (VAPP). La descrizione dettagliata del caso è riportata in seguito (PAG. 80).

Relativamente agli indicatori di performance promossi dall'OMS per il buon andamento della sorveglianza delle PFA, la Regione Lombardia ha ottenuto sia nel 2013 che nel 2014 risultati soddisfacenti (Tabella 2) al contrario di quello accaduto nel 2012 ed il 2015. Nel 2015 tuttavia l'attività è considerata solo per il periodo da gennaio ad ottobre 2015.

Anno	n. PFA Registrati	n. PFA Attesi	Età media (anni)	IQR (anni)	campioni fecali idonei	Incident Index	Surveillance index	EVNP Positivi	PV positivi	Follow-up a 60/90 gg
2012	11	13	7,1	11,9	63,6%	0,8	0,54	18,2%	0,0%	72,7%
2013	20	13	6,0	11,3	60,0%	1,5	0,92	15,0%	5% *	75,0%
2014	14	13	5,2	8,5	85,7%	1,1	0,92	14,3%	0,0%	100,0%
2015 †	7	11	4,2	4,1	85,7%	0,6	0,55	0,0%	0,0%	in corso
Tot	52	50	5,8	10,0	71,2%	1,04	0,77	11,5%	1,9%	82,2%**
Valori/Indicatori Attesi	52	-	-	-	≥ 80%	≥1	≥1	≥ 10%	-	≥80%

† Dati valutati da Gennaio ad Ottobre

* PV-SL3

** dati Elaborati dal 2012 al 2014

Tabella 2: Caratteristiche demografiche, criteri di performance e risultati virologici dei casi PFA registrati in Lombardia, 2012-2015* (*gennaio-ottobre).

La distribuzione spaziale (Province e reparti ospedalieri) e temporale dei casi di PFA per anni è mostrata in Fig. 19. Complessivamente, circa il 30% (14/52) dei casi è stato segnalato da enti siti nella provincia di Milano e circa il

20% (10/52) dalla provincia di Bergamo (Fig 19-a). Il restante 50% era distribuito come riportato in figura 19-a; il 67% (35/52) dei casi proveniva dai reparti di Pediatria ed il 17% (9/52) dalla Neuropsichiatria Infantile (NPI) (Fig 19-b).

Considerando l'andamento temporale (mensile e stagionale) dei casi di PFA segnalati, si evidenzia un aumento statisticamente significativo dei casi registrati a Luglio (17.3%; 9/52) ed Ottobre (19.2%; 10/52) per tutto il periodo di studio ($p < .05$) (Fig 19-c). Complessivamente, il periodo estivo-autunnale è stato quello in cui è esordito il maggior numero dei casi con 31 notifiche su 52 (circa il 60%) (Fig. 19-d).

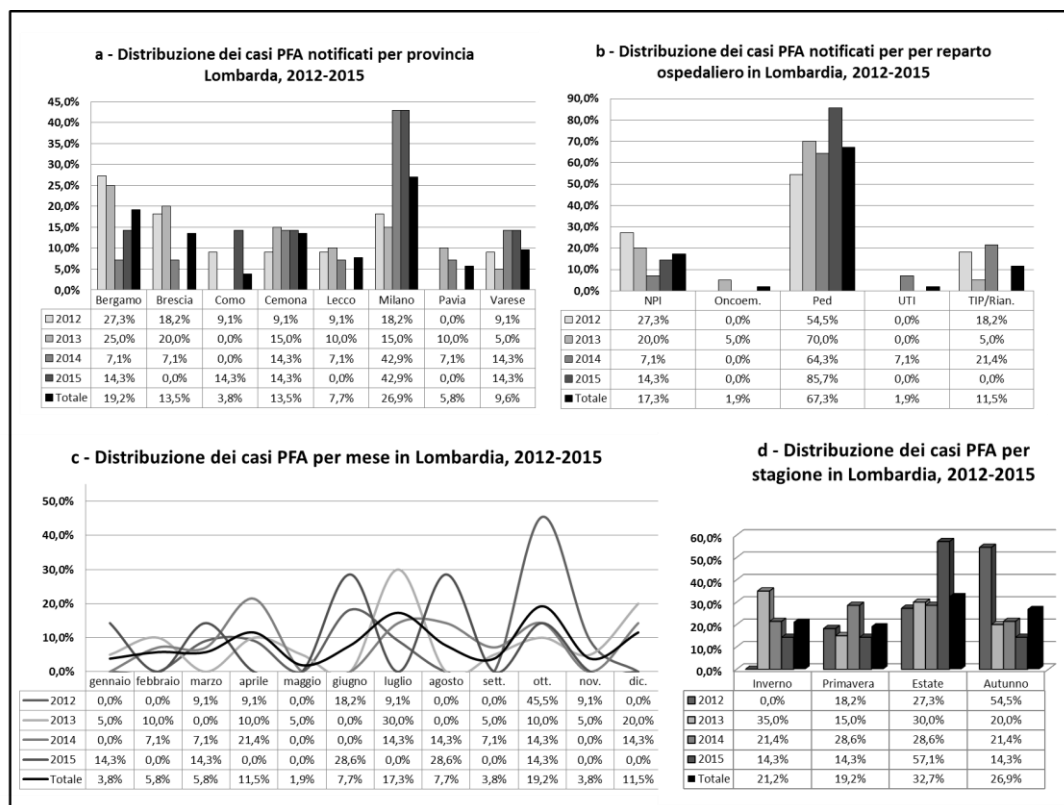


Fig. 19. Distribuzione spaziale e temporale dei casi PFA registrati in Lombardia dal 2012 al 2015* (*gennaio-ottobre).

Per quanto riguarda la diagnosi associata alle PFA osservate nell'intero periodo di studio, la quota più significativa ($p < .05$) era rappresentata dalla SGB, riconosciuta nel circa il 40% (21/52) delle diagnosi iniziali e nel 38.5% (20/52) delle diagnosi conclusive al follow-up clinico. Come si può vedere dalla tabella 3, tutte le PFA senza una diagnosi precisa e differenziale in entrata (19.2%; 10/52) sono state caratterizzate al follow-up, come strettamente richiesto da OMS. Tra queste una era identificata al follow-up clinico come VAPP (1.9%; 1/52).

Tabella 3: Distribuzione casi di PFA per diagnosi iniziale e finale in Lombardia, 2012-2015* (*gennaio-ottobre).

Diagnosi associate a PFA (2012-2015)	Diagnosi Iniziale		Diagnosi finale	
	n.	%	n.	%
Mielite/Mielopatia/Mieloradicolite	8	15,4%	10	19,2%
Ipotonia/Deficit motorio/Ipostenia/Diplopia	9	17,3%	3	5,8%
Poliradicoloneurite/SGB	21	40,4%	20	38,5%
Paralisi flaccida arti non definita	10	19,2%	/	0,0%
Altro (LLA/Ascesso/Ischemia)	4	7,7%	4	15,4%
Malattia genetica	/	0%	1	7,7%
VAPP	/	0%	8	1,9%
Non disponibile/In corso	/	0%	6	11,5%

*SGB: Sindrome di Guillain-Barrè

**VAPP: Paralisi Associata a Vaccino

Per 10 casi di PFA sui 52 (19.3%) notificati, non era nota la schedula vaccinale adottata o non si conosceva se il soggetto avesse ricevuto vaccinazione anti-Polio. Tra i restanti noti, in 37 (88%) casi era stata utilizzata solamente la formulazione IPV, per 1 (2.4%) caso era stata utilizzata la schedula mista mentre il caso in cui era stata somministrata la sola formulazione OPV (2.4%) era quello che era risultato associato a VAPP (Fig. 20). I 3 bambini che non erano vaccinati contro PV avevano meno di 3 mesi e quindi non ancora arruolabili per il ciclo vaccinale.

E' stato possibile esaminare il titolo di anticorpi neutralizzanti il PV per 48/52 (92.3%) casi di PFA. Livelli anticorpali protettivi verso tutti i tre sierotipi erano rilevati per 45/48 casi di PFA pari al 94% del totale. Dei tre bambini con insufficienti livelli protettivi due avevano meno di 3 mesi ed erano affetti da SMA-Tipo-1, quindi non vaccinati ed immuno-compromessi, mentre l'altro bambino aveva 13 anni e titoli anticorpali insufficienti solamente per il PV tipo 1. Tutti i casi PFA per i quali non era noto lo stato vaccinale avevano mostrato livelli anticorpali protettivi mentre tra i tre bambini con età inferiore ai tre mesi e quindi non ancora vaccinati solamente 1 (33%) mostrava anticorpi neutralizzanti di probabile derivazione materna.

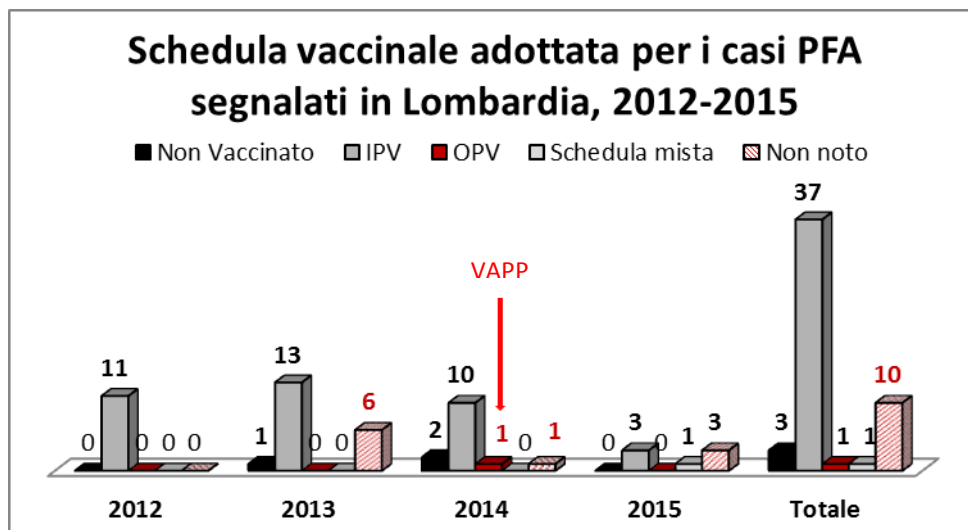


Fig. 20. Stato vaccinale relativo ai casi di PFA in Lombardia, 2012-2015* (*gennaio-ottobre).

3.1.1. Case report di VAPP, 2014

Nel luglio del 2014 veniva notificato dal reparto di Pediatria dell'Ospedale S. Matteo di Pavia un caso di sospetta VAPP in un bambino albanese di 6 mesi affetto da morbo di Bruton, nota anche come agammaglobulinemia-X. Il morbo

di Bruton è una immunodeficienza caratterizzata dall'estrema riduzione o assenza delle 5 classi di immunoglobuline che si manifesta solo nel sesso maschile con trasmissione legata a cromosoma X. La sintomatologia inizia tipicamente verso il sesto mese di vita ed è caratterizzata dalla manifestazione di infezioni batteriche a livello respiratorio e/o enteriti croniche. La diagnosi svolta attraverso esami clinici è possibile in fase prenatale e si basa sul dosaggio dei livelli delle immunoglobuline. La terapia si avvale della somministrazione ciclica di immunoglobuline parenterali.

Il bambino in esame era stato ricoverato a giugno 2014 presso il 'Mother Teresa' University Hospital Center di Tirana con sintomatologia riferibile ad una PFA asimmetrica agli arti superiori ed inferiori associata alla perdita di riflesso osteotendineo e ad un principio di paralisi respiratoria; il bambino presentava inoltre febbre alta (>39°C, persistente da oltre tre giorni) ed enterite acuta. In quella sede era stata ipotizzata la presenza di una VAPP in quanto il bambino aveva ricevuto circa 1 mese e mezzo prima (cioè al quarto mese di vita) una dose di vaccino OPV. È da evidenziare che la somministrazione della dose di vaccino OPV era stata effettuata prima della diagnosi clinica di Sindrome di Bruton, avvenuta solamente in presenza della manifestazione di paralisi e non in epoca prenatale. Per ricevere adeguate cure (immunoglobuline umane somministrate endovena, antibiotici, terapia vitaminica e fisioterapia) il bambino era poi stato trasferito nel mese di luglio presso l'Ospedale di Pavia, dove la rete di sorveglianza PFA lombarda si era attivata avendo riconosciuto il caso di PFA. Presso il nostro laboratorio di Virologia era stata poi accertata la presenza di PV Tipo-3. Presso l'Istituto Superiore di Sanità contestualmente erano state svolte prove per identificare la natura del PV e definire le mutazioni a livello del PV-Sabin Like. Per verificare un'eventuale escrezione cronica di PV da parte del soggetto VAPP con agammaglobulinemia, a settembre 2014 è stato effettuato un ulteriore campionamento fecale, seguito da analisi virologica. L'isolamento del virus ha dato esito negativo.

3.2. *Sorveglianza ambientale dal 2012 al 2015*

Durante la sorveglianza ambientale svolta nel territorio di Milano presso i depuratori di Peschiera Borromeo, Nosedo e Nosedo ampliamento Est, nessun campione ambientale è risultato positivo in per PV in coltura cellulare L20b, mentre i risultati ottenuti dall'isolamento in coltura cellulare RD sono dettagliati in tabella 4. Complessivamente 172/273 (65.2%) campioni ambientali sono risultati positivi alla presenza di EVNP con una differente distribuzione per anno e depuratore in studio.

% EVNP	2012	2013	2014	2015*	Totale	P-value
Peschiera n=88	80.8%	54.2%	50.0%	64.3%	62.5%	> .05
Nosedo n=88	64.7%	54.2%	83.3%	69.6%	68.2%	> .05
Nosedo ampl EST n=88	58.8%	62.5%	66.7%	69.6%	64.8%	> .05
Totale	70.0%	56.9%	66.7%	68.3%	65.2%	
P-value	> .05	< .05	> .05	> .05		

Tabella 4. Quota di EVNP isolati per depuratore ed anno di studio in Lombardia (*gennaio-ottobre).

La quota di EVNP rilevata nel 2012 è stata pari al 70% (42/60) poi scesa a circa il 57% (41/72) nel 2013, risalita a circa il 67% (48/72) nel 2014 ed in ultimo la percentuale di EVNP rilevata nei campioni raccolti da gennaio ad ottobre 2015 è stata pari al 68.3% (41/60). Nel 2013 la quota di EVNP è stata statisticamente inferiore rispetto agli altri periodi di studio ($p < .05$). Considerando i singoli depuratori in studio, valori simili di positività ad EVNP ($p > .05$) erano trovati e nel dettaglio i liquami positivi erano 62.5% (55/88) per Peschiera

Borromeo, 68.2% (60/88) per Nosedo ed 64.8% (57/88) per Nosedo ampliamento EST.

E' stato possibile caratterizzare 141 EVNP su 172 isolati (circa 82%). Complessivamente la distribuzione dei genotipi è mostrata in fig. 21

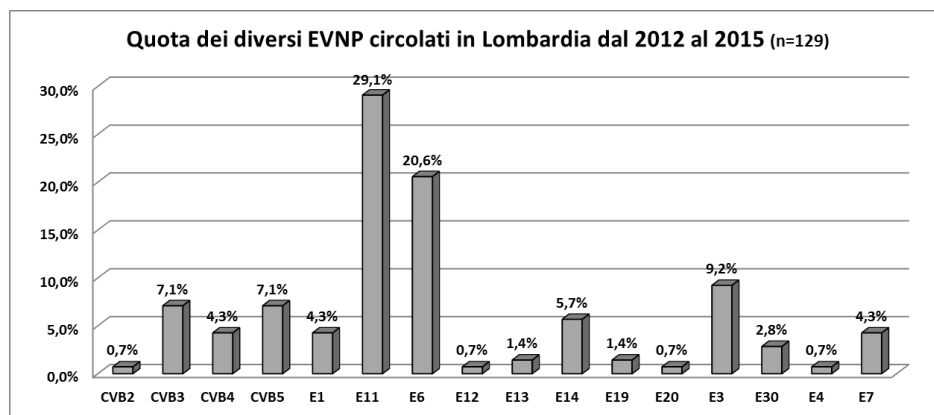


Fig. 21: Distribuzione dei genotipi di EVNP circolati in Lombardia dal 2012-2015 (*gennaio-ottobre).

Tutti gli EVNP circolati nel periodo di studio appartengono ad EVNP di gruppo B. Circa 1/3 sono stati caratterizzati come E11 (41/141; 29.1%) mentre E6 ed E3 erano rilevati in 29/141 (20.6%) ed in 13/141 (9.2%) campioni ambientali, rispettivamente. Non si sono evidenziati caratteristici pattern stagionali relativamente ai genotipi circolati; tuttavia E11 ha evidenziato un trend in decremento dal 2012 al 2014, passando da un valore del 26% (33/42) nel 2012, 3.1% (4/27) nel 2013, fino a 0.8% (1/41) nel 2014, risalendo poi al 9.7 % (3/31) nel 2015.

4. Discussione

La poliomielite è una malattia acuta virale altamente contagiosa causata dai tre sierotipi di PV che colpisce principalmente i bambini di età inferiore a 5 anni. È stata per molto tempo endemica, anche a livello italiano ma con l'impiego dei vaccini di Sabin (OPV) e di Salk (IPV) e con il lancio da parte dell'OMS del GPEI a partire dagli anni '60, le grandi epidemie sono rapidamente scomparse, ed ad oggi solamente due Paesi, Pakistan ed Afghanistan, rimangono endemici per PV. Nonostante i casi di poliomielite siano oggi diminuiti del 99%, PV esiste ancora ed epidemie come quelle registrate in Tajikistan nel 2010 ed in Siria nel 2013 a seguito di reintroduzione del virus sono una realtà che dimostra come i sistemi di sorveglianza debbano proseguire ed incrementare in quest'ultima fase del progetto di eradicazione della poliomielite.

L'Italia, che è importante crocevia di popoli in fuga da guerre e povertà ed è considerata da OMS a rischio di reintroduzione di PV, svolge la sorveglianza delle PFA dal 1997 [46] e la ES è stata attivata in alcune città a partire dal 2006 [48;50]. Precedenti studi italiani hanno tuttavia sottolineato come la sorveglianza delle PFA non sempre raggiunga i livelli di adeguatezza richiesti da OMS [46; 52-55]; inoltre, PV di origine vaccinale OPV erano rilevati a Milano come in altre città Italiane durante la ES sebbene in Italia sia in uso la schedula vaccinale solo IPV sin dal 2002 [48; 50]. Proprio la ES sta diventando sempre più indicata come attività di sorveglianza verso PV, poiché in grado di rilevare la presenza del virus in assenza di sintomi nella popolazione, come recentemente evidenziato a Rio de Janeiro ed Israele [56; 57] e soprattutto consigliata in quei Paesi in cui si vaccina solo con IPV. Oggigiorno in Italia la ES è svolta solamente in 6 città: Bolzano, Milano, Parma, Sassari, Napoli e Palermo [50].

Considerando l'intero periodo di studio, la sorveglianza delle PFA ha raggiunto il criterio di idoneità relativo alla sensibilità della rete, avendo registrato dal 2012 al 2015 un'incidenza dei casi con un valore pari a 1.04 a fronte di un valore ottimale uguale o maggiore a 1 (35). Analizzando anno per

anno, nel 2012 la rete di sorveglianza PFA aveva mostrato livelli di sensibilità inferiori a quanto richiesto probabilmente perché i medici sentinella arruolati nella rete non riponessero sufficiente attenzione nella sorveglianza della polio, sia a causa dell'assenza del virus nella nostra popolazione da numerosi anni sia perché la sorveglianza del PV fosse un tema poco discusso. Per migliorare la situazione a partire dal 2013 sono state preparate diverse attività atte ad aumentare la sensibilità della rete tra cui l'organizzazione di giornate di formazione/workshop in associazione con il Ministero ed ISS, l'invio trimestrale dei risultati delle attività di sorveglianza, la condivisione di bollettini epidemiologici relativi a PV ed i report preparati da OMS.

Questi interventi hanno portato ad un netto miglioramento dell'andamento della rete sia in termini di sensibilità sia in termini di completezza delle indagini virologiche. Infatti, anche il valore di 'Surveillance Index' che nel 2012 era risultato di 0.54, a partire dal 2013 risultava pari a 0.94 a fronte di un valore atteso pari a 1.

Ad ogni modo, i criteri di performance delle rete Lombarda registrati a partire dal 2012 sono migliorati rispetto al passato (1997-2011) in cui l'indice di incidenza medio era risultato solamente dello 0.7 [46].

La maggior parte dei casi di PFA erano segnalati in estate (circa il 33%), diversamente dai risultati registrati dal 1997 al 2011, dove l'incidenza massima si registrava nei mesi invernali [46], e come atteso dagli enti siti nella provincia di Milano e dai reparti di Pediatria [46]. Come riportato da altri studi, l'età media dei casi di PFA era compresa tra i 5 ed i 6 anni [46,]. E' ampiamente risaputo, che la Sindrome di Guillain-Barrè sia la diagnosi (iniziale e conclusiva) maggiormente riscontrata durante la sorveglianza delle PFA [46; 58]; anche nel nostro studio, abbiamo ritrovato questa situazione, con il 40% delle PFA associate a Sindrome di Guillain-Barrè. Le strategie vaccinali attuate in Italia, e quindi in Lombardia, hanno dimostrato di offrire una protezione anticorpale adeguata verso il PV per quasi la totalità dei bambini indagati con PFA (94%) e di essere in linea con precedenti dati nazionali ottenuti da studi epidemiologici in

popolazioni sane [42]. I bambini senza idonei livelli immunitari verso PV avevano dimostrato situazioni immunitarie particolari, associate a immunocompromissione e alla presenza di gravi sindromi genetiche.

Nel periodo di studio, nessun caso di PFA associata a PV selvaggio e/o VDPV è stato osservato come atteso ed in linea con la situazione epidemiologica europea. Tuttavia, la sorveglianza della PFA ha rilevato la presenza di un unico caso (luglio 2014) di infezione da PV-Sabin Like di tipo 3 associato a VAPP in un bambino albanese vaccinato con OPV e presentante una sindrome legata ad agammaglobulinemia. Questo dato sottolinea l'importanza di sospendere del tutto l'utilizzo di OPV, proprio per evitare i possibili casi di VAPP e la formazione di Vaccine-Derived Poliovirus (VDPV) che potrebbero causare epidemie in popolazioni libere da polio, rappresentando un'emergenza di Sanità Pubblica. Gli ultimi 2 casi di VAPP segnalati in Lombardia risalgono al 1997, quando la schedula vaccinale italiana prevedeva l'impiego di OPV [46].

Durante la sorveglianza della PFA, è stato possibile evidenziare la presenza di EVNP in 6 casi (11.5% del totale). Rimane da chiarire se la presenza di EVNP sia la causa della paralisi in questi soggetti o se sia semplicemente indicativa di una circolazione asintomatica di EVNP nella popolazione. Interessante è sottolineare la totale assenza di EVNP riscontrata nei campioni fecali dei casi di PFA raccolti tra gennaio-ottobre 2015. Questo potrebbe essere spiegato da una minore circolazione di EVNP nella popolazione in studio.

Durante la ES svolta dal 2012 al 2015 a Milano, nessun PV è stato individuato sebbene un'alta circolazione di EVNP era rilevata, con circa il 65% di campioni ambientali positivi. Questo dato da un lato conferma il buon funzionamento dell'attività di sorveglianza stessa in quanto nel corso della ES è atteso un valore di positività ad EVNP pari o maggiore al 30% [49], dall'altro lato indica un'ampia circolazione virale nella popolazione Lombarda afferente ai depuratori. Questi risultati sono sovrapponibili a quelli ottenuti in studi precedenti svolti nello stesso territorio [48] ed a dati Francesi e Spagnoli dove la

quota di ENPV isolata durante la ES era pari al 78% e all'84%, rispettivamente [59; 60]. Nessuna differenza nella quota di EVNP circolata tra i singoli depuratori in studio era evidenziata, sebbene una quota statisticamente inferiore di virus era stata rilevata nel 2013 rispetto agli altri anni di studio. Questo aspetto potrebbe essere chiarito confrontando i valori relativi al livello di inquinanti ambientali presenti nei liquami in quel periodo, che potrebbero aver compromesso la vitalità virale.

Purtroppo in Italia, diversamente da altri Paesi Europei, non sono attivi sistemi di sorveglianza verso gli EVNP e quindi è difficile valutare la quota circolati nella popolazione sana o manifestante particolari quadri clinici. L'alta quota di EVNP ritrovata nell'ambiente ne sottolinea l'ampia circolazione nella popolazione in studio e studi retrospettivi potrebbero indicarne l'interessamento clinico, come recentemente dimostrato da Bubba L. *et al* [61] in cui in circa il 25.2% delle gastroenteriti acute pediatriche (<5 anni d'età) era identificata la presenza di EVNP. I dati di genotipizzazione hanno mostrato la circolazione di numerosi genotipi, tutti appartenenti agli EVNP di Gruppo B. I genotipi E11 ed E6 sono risultati i maggiormente circolati ed è noto in letteratura che questi genotipi siano frequentemente associati a meningiti ed altri manifestazioni cliniche gravi di natura epidemiche [62; 63]. Appare chiaro che disporre di campioni ambientali prelevati per la sorveglianza polio, renda possibile studi di sorveglianza di EVNP, che se associati ad altri svolti direttamente sulla popolazione sintomatica o no, potrebbero permettere di chiarire alcuni aspetti relativi alle infezioni sostenute da EV [48; 64; 65] e di svolgere valutazioni filogeografiche e filodinamiche sui ceppi circolanti [66]. Uno studio Finlandese ha mostrato che un'epidemia sostenuta da E30 verificata nel 2009 era preceduta da un'alta frequenza di isolamento dei virus sia dai liquami che da campioni clinici. Approfonditi studi filodinamici hanno mostrato che il ceppo virale interessato nei casi clinici era lo stesso che era stato isolato per molti anni nell'ambiente prima della manifestazione dell'epidemia [66], dimostrando come

la sorveglianza ambientale di EVNP possa essere uno strumento da prendere in considerazione per una tempestiva valutazione dei casi di infezioni severe nella popolazione [66].

Concludendo, la situazione epidemiologica mondiale fa ben sperare in un prossimo conseguimento dell'obiettivo di eradicazione. Fino a quel momento il rischio di importazione del virus esisterà comunque, anche in Paesi in cui il PV ha smesso di circolare da anni o in Paesi che sono stati dichiarati da tempo "polio-free". Per non vanificare gli sforzi fatti finora è fondamentale agire attraverso due strategie parallele: i) mantenere ed eventualmente innalzare i livelli di immunizzazione nella popolazione mondiale verso PV e, ii) proseguire ed intensificare le attività di controllo della polio attraverso la sorveglianza delle PFA e la sorveglianza ambientale dei reflui urbani.

I risultati di questo studio hanno mostrato che organizzare giornate formative, avere stretti contatti con i medici sentinella arruolati nella rete ed inviare report relativi all'andamento della rete e bollettini epidemiologici relativi alla circolazione di PV siano strategie vincenti nell'aumentare la sensibilità della rete di sorveglianza PFA. La ES dovrebbe essere incrementata in più centri in Italia, come sta avvenendo in altri Paesi europei, per poter essere in grado di rilevare nel più breve tempo possibile eventuali reintroduzioni di PV; inoltre si è mostrata un valido strumento per indagare la presenza di EVNP nella popolazione in studio. Mantenere elevati livelli di immunizzazione contro PV nella popolazione italiana grazie alle campagne vaccinali routinarie rimane fondamentale e fortemente richiesta.

5. Allegati

**Allegato 1. Quadri clinici caratterizzati da Paralisi Flaccida Acuta
identificati attraverso ICD-9 Code**

NON-EXHAUSTIVE LIST OF NEUROLOGIC ILLNESSES TO AID IN CODING CLINICAL DIAGNOSIS CLASSIFICATION				
PARTICULARLY IF ICD CODES ARE USED				
Clinical				
class.	Illness	(X refers to all codes after the decimal point)		
-26	Category	ICD9 code	ICD10 code	Example Condition
0	Not AFP	351.x	G51.0	Facial paralysis
0	Not AFP	343.x	G80.x, G83.9	Cerebral palsy, spastic paralysis
0	Not AFP	047.x, 321.x	A87.0, G02.0, G03.0, G03.9	aseptic meningitis
0	Not AFP	320.8, 320.9	G00.x	bacterial meningitis
0	Not AFP	323.x	G04.x	Encephalitis, myelitis and encephalomyelitis§
0	Not AFP	48	A88	Other viral infections of central nervous system, not elsewhere classified
0	Not AFP	49,9	A89	Unspecified viral infection of central nervous system
1	Clinical Polio	45.x	A80.x	Acute poliomyelitis
1	Clinical Polio	232,2	G12.2	Polioencephalitis -inferior (progressive bulbar palsy; motor neuron disease)#
2	GBS and other demyelinating diseases	357,1	G61.0	Gulfain-Barré Syndrome
2	GBS and other demyelinating diseases	341,9	G36.x	Other acute disseminated demyelination
2	GBS and other demyelinating diseases	341	G37.x	Other demyelinating diseases of central nervous system
3	Transverse myelitis	323,5	G04.8	Post-infection myelitis
3	Transverse myelitis	323,9	G37.3	Transverse myelitis
4	Traumatic and specific neuropathy	353	G54	Nerve root and plexus disorders
4	Traumatic and specific neuropathy	354	G56	Mononeuropathies of upper limb
4	Traumatic and specific neuropathy	355	G57	Mononeuropathies of lower limb
4	Traumatic and specific neuropathy	355,9	G58	Other mononeuropathies
4	Traumatic and specific neuropathy	956	S74.0	Traumatic neuritis (sciatic nerve)
4	Traumatic and specific neuropathy	956,1	S74.1	Traumatic neuritis (femoral nerve)
4	Traumatic and specific neuropathy	956,9	S74.8, S74.9	Traumatic neuritis (unspecified nerve of pelvic girdle and lower limbs)
5	Neoplasm/cord space-occupying lesion	170.2, 170.6	C41.2, C41.4, C47.9	Malignant neoplasm of spinal cord, coccyx/sacrum, nerve root, primary
5	Neoplasm/cord space-occupying lesion	198.3, 198.4	C79.3-8	Malignant neoplasm of spinal cord, coccyx/sacrum, nerve root, secondary
5	Neoplasm/cord space-occupying lesion	192.3, 225.4	C70.1, C79.4, D32.1, D42.1	Malignant, benign and unknown behavior neoplasms of membranes
5	Neoplasm/cord space-occupying lesion	213.6, 225.3, 239.2, 239.7	D16.6-9, D48.0-2, D36.1	Benign and unknown behavior neoplasms of spinal cord, coccyx/sacrum, nerve root
5	Neoplasm/cord space-occupying lesion	952.x	S24.1, S34.4	Spinal cord injury, hematoma
5	Neoplasm/cord space-occupying lesion	324.1	G06.1	Spinal epidural abscess
6	Peripheral neuropathy from infection or toxin	989,5	T63.4	Tick paralysis
6	Peripheral neuropathy from infection or toxin	357.x	G61.1-9, G62.x, G63.x	Inflammatory and toxic polyneuropathy
6	Peripheral neuropathy from infection or toxin	985	T56	Toxic effect of metals
7	Other specific neurologic illness	340	G35	Multiple sclerosis
7	Other specific neurologic illness	344,8	G83.8	Other specified paralytic syndrome*
7	Other specific neurologic illness	356	G60	Hereditary and idiopathic neuropathy
8	Systemic, bone or muscle illness	124	B75	Trichinosis
8	Systemic, bone or muscle illness	728.x, 729.x	M60.0, M60.1, M61.1	Myositis
8	Systemic, bone or muscle illness	277,1	E80.2	Porphyria
9	Paralysis of unknown cause, or not specified	342	G81	Hemiplegia*
9	Paralysis of unknown cause, or not specified	344.x	G82.x & G83.x	Plegia*
9	Paralysis of unknown cause, or not specified	344	G82.x	Quadriplegia*
9	Paralysis of unknown cause, or not specified	344,1	G82.x	Paraplegia*
9	Paralysis of unknown cause, or not specified	344,2	G83.0	Lower Diplegia*
9	Paralysis of unknown cause, or not specified	344,3	G83.1	Lower Monoplegia*
9	Paralysis of unknown cause, or not specified	344,4	G83.2	Upper Monoplegia*
9	Paralysis of unknown cause, or not specified	344,5	G83.3	Unspecified monoplegia*
9	Paralysis of unknown cause, or not specified	344,6	G83.4	Cauda Equina Syndrome*
9	Paralysis of unknown cause, or not specified	359,9	G72.8	Flaccid muscle paralysis
9	Paralysis of unknown cause, or not specified	781,4	R29.8	Transient paralysis of a limb
9	Paralysis of unknown cause, or not specified	337	G64	Other disorders of peripheral nervous system

Allegato 2. Report quindicinale 'zero casi'

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 _____

Allegato 3. Modulo segnalazione iniziale

Sorveglianza AFP
Segnalazione iniziale

Data ____/____/____

Regione _____ Provincia _____ ASI _____
Cognome e nome _____ Sesso _____
Luogo di nascita _____ Data ____/____/____
Domicilio _____ Tel _____
Residenza (se diversa dal domicilio) _____
Affetto da _____ dal ____/____/____
Ricovertito presso _____ dal ____/____/____
Reparto _____ Indirizzo _____

febbre all'inizio della paralisi: sì no non noto
progressione della paralisi entro 4 giorni dall'inizio dei sintomi: sì no non noto
asimmetria della paralisi: sì no non noto

localizzazioni paralisi: arti arti e musc. respiratori bulbare facciale non noto
Vaccinazione antipolio (indicare data e tipo di vaccino per ciascuna dose): sì no non noto

I dose ____/____/____ II dose ____/____/____ III dose ____/____/____ IV dose ____/____/____
IPV OPV IPV OPV IPV OPV IPV OPV

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 Ist. Sup. di Sanità Università degli Studi di Milano
Dip. della Prevenzione C.R.I.V.I.B. Dip. Scienze Biomediche per la Salute
Ufficio V. Malattie Infettive Viale Regina Elena, 299 Via C. Pascal, 36
Via G. Ribotta, 5 00161 Roma 20133 Milano
00144 Roma Tel. 06 4990237 virolab@unimi.it
Tel. 06 59943566 Tel. 02 50315125
Fax 06 59943096 Fax 02 50315120

Allegato 4. Modulo conferma campioni biologici


Sorveglianza AFP

Data _____

CONFERMA DEI PRELIEVI

Regione _____ Provincia _____ ASL _____
 Cognome e nome _____ Sesso _____
 Luogo di nascita _____ Data _____

Date di raccolta dei campioni:
 Il campione di feci _____ Il campione di fedi _____
 Il 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	Ist. Sup. di Sanità	Università degli Studi di Milano
Dip. della Prevenzione	C.R.I.V.I.B.	Dip. Scienze Biomediche per la Salute
Viale Pasteur, 5	Viale Regina Elena, 299	C.P. Pascal, 36
00144 Roma	20133 Milano	20133 Milano
Tel. 06 59943856	Tel. 06 49903237	virolab@unimi.it
Fax 06 59943096	Fax 06 49902082	Tel. 02 50315125
		Fax 02 50315120

Allegato 5. Modulo follow-up clinico a 60-90 giorni dall'esordio


Sorveglianza AFP

Data _____

Follow-up a 60-90 giorni

Regione _____ Provincia _____ ASL _____
 Cognome e nome _____ Sesso _____
 Luogo di nascita _____ Data _____

Paralisi presente dopo 60-90 giorni no sì

Sito eventuale paralisi

gamba sinistra	<input type="checkbox"/>	musc. respiratori	<input type="checkbox"/>
gamba destra	<input type="checkbox"/>	nervi cranici	<input type="checkbox"/>
braccio destro	<input type="checkbox"/>	altro (specificare)	_____
braccio sinistro	<input type="checkbox"/>		

Miglioramento della paresi/paralisi rispetto alla fase a cura: no sì

Commenti sull'eventuale grado di miglioramento _____

Allegare, se disponibili, il rapporto neurologico e/o referti strumentali _____

Diagnosi finale

poliomielite	<input type="checkbox"/>
Sindrome di Guillain-Barré	<input type="checkbox"/>
poli-radicoloneurite/Sindrome di Landry	<input type="checkbox"/>
mielite trasversale	<input type="checkbox"/>
neuropatia traumatica	<input type="checkbox"/>
meningite	<input type="checkbox"/>
encefalite	<input type="checkbox"/>
compressione spinale	<input type="checkbox"/> specificare _____
(danneo piaia, ascesso, ematoma)	
malattie sistemiche o metaboliche	<input type="checkbox"/> specificare _____
altro	<input type="checkbox"/> specificare _____

Medico responsabile _____ Data del follow-up _____

La presente scheda va inviata via fax contemporaneamente a:

Ministero della Salute	Ist. Sup. di Sanità	Università degli Studi di Milano
Dip. della Prevenzione	C.R.I.V.I.B.	Dip. Scienze Biomediche per la Salute
Viale Pasteur, 5	Viale Regina Elena, 299	C.P. Pascal, 36
00144 Roma	20133 Milano	20133 Milano
Tel. 06 59943856	Tel. 06 49903237	virolab@unimi.it
Fax 06 59943096	Fax 06 49902082	Tel. 02 50315125
		Fax 02 50315120

6. Bibliografia

1. The Gale Encyclopaedia of Neurological Disorders. Detroit, Thomson Gale, 2005, pp. 1859–70, ISBN 0-7876-9150-X.
2. World Development Report, Poliomyelitis, World Health Organization, Geneva. 1955. e: Investing in health. World Development Indicators, Oxford University Press, New York, 1993
3. Horstmann D.M., Poliomyelitis: severity and type of disease in different age groups, *Ann N Y Acad Sci* 1955; 61: 956-967
4. Bruno RL. Paralytic vs. "nonparalytic" polio: distinction without a difference. *Am J Phys Med Rehabil.* 2000 Jan-Feb;79(1):4-12. Review.
5. Abrar A, Ahmad A. Post poliomyelitis syndrome: A rare sequel of acute poliomyelitis. *J Pak Med Assoc.* 2015 Mar;65(3):327-9.
6. WHO. Poliomyelitis. (available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs114/en/>)
7. Pallansch M.A., Roos R.P., Enteroviruses: Polioviruses, Coxsackieviruses, Echoviruses and Newer Enteroviruses, 2001.
8. Piralla A, Daleno C, Scala A, Greenberg D, Usonis V, Principi N, Baldanti F, Esposito S; CAP-PRI Study Group. Genome characterisation of enteroviruses 117 and 118: a new group within human enterovirus species C. *PLoS One.* 2013;8(4):e6064
9. Rotbart H.A., "Enteroviral infections of the central nervous system", *Clin Infect Dis* 1995; 20: 971-981.
10. Adeniji JA, Faleye TO. Enterovirus C strains circulating in Nigeria and their contribution to the emergence of recombinant circulating vaccine-derived polioviruses. *Arch Virol.* 2015 Mar;160(3):675-83
11. Jiang P, Liu Y, Ma HC, Paul AV, Wimmer E. Picornavirus morphogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2014 Sep;78(3):418-37
12. Flather D, Semler BL. Picornaviruses and nuclear functions: targeting a cellular compartment distinct from the replication site of a positive-strand RNA virus. *Front Microbiol.* 2015 Jun 18;6:594.

13. Sullivan DP, Seidman MA, Muller WA. Poliovirus receptor (CD155) regulates a step in transendothelial migration between PECAM and CD99. *Am J Pathol.* 2013 Mar;182(3):1031-42
14. 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.
15. Khan S, Toyoda H, Linehan M, Iwasaki A, Nomoto A, Bernhardt G, Cello J, Wimmer E. Poliomyelitis in transgenic mice expressing CD155 under the control of the TAGE4 promoter after oral and parenteral poliovirus inoculation. *J Gen Virol.* 2014 Aug;95(Pt 8):1668-76.
16. 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.
17. Wood DJ, Hull B. L20B cells simplify culture of polioviruses from clinical samples. *J Med Virol.* 1999 Jun;58(2):188-92.
18. 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.
19. 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.
20. 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-hydroxybenzyl)-benzimidazole or guanidine HCl. *J Gen Virol* 1970; 6:151-161.
21. 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.
22. Paul J.R. , Riordan J.T. , Kraft L.(*The Journal of Immunology*,1951).Serological epidemiology; Antibody patterns in north Alaskan Eskimos.

23. Samoilovich E, Roivainen M, Titov LP, Hovi T. Serotype-specific mucosal immune response and subsequent poliovirus replication in vaccinated children. *J Med Virol.* 2003 Oct;71(2):274-80.
24. Mohanty MC, Nalavade UP, Deshpande JM. Serum IgG and IgA levels in polio and non-polio acute flaccid paralysis cases in western Uttar Pradesh, India. *Indian Pediatr.* 2015 Mar 8;52(3):220-2
25. Parker EP, Molodecky NA, Pons-Salort M, O'Reilly KM, Grassly NC. Impact of inactivated poliovirus vaccine on mucosal immunity: implications for the polio eradication endgame. *Expert Rev Vaccines.* 2015;14(8):1113-2
26. Thompson KM, Duintjer Tebbens RJ. The differential impact of oral poliovirus vaccine formulation choices on serotype-specific population immunity to poliovirus transmission. *BMC Infect Dis.* 2015 Sep 17;15:376
27. Platt LR, Estívariz CF, Sutter RW. Vaccine-associated paralytic poliomyelitis: a review of the epidemiology and estimation of the global burden. *J Infect Dis.* 2014 Nov 1;210 Suppl 1:S380-9
28. Thompson KM, Duintjer Tebbens RJ. The differential impact of oral poliovirus vaccine formulation choices on serotype-specific population immunity to poliovirus transmission. *BMC Infect Dis.* 2015 Sep 17;15:376.
29. Burns CC, Diop OM, Sutter RW, Kew OM. Vaccine-derived polioviruses. *J Infect Dis.* 2014 Nov 1;210 Suppl 1:S283-9
30. Hennessey KA, Lago H, Diomande F, Akoua-Koffi C, Caceres VM, Pallansch MA, Kew OM, Nolan M, Zuber PL. Poliovirus vaccine shedding among persons with HIV in Abidjan, Cote d'Ivoire. *J Infect Dis.* 2005 Dec 15;192(12):2124-8
31. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Laboratory surveillance for wild poliovirus and vaccine-derived poliovirus, 2000-2001. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2002 May 3;51(17):369-71.
32. Jenkins HE et al. Implications of a Circulating Vaccine-Derived Poliovirus in Nigeria. *NEJM* 2010;362:2360-9.
33. Estívariz CF, Anand A, Gary HE Jr, Rahman M, Islam J, Bari TI, Wassilak SG,

- Chu SY, Weldon WC, Pallansch MA, Heffelfinger JD, Luby SP, Zaman K. Immunogenicity of three doses of bivalent, trivalent, or type 1 monovalent oral poliovirus vaccines with a 2 week interval between doses in Bangladesh: an open-label, non-inferiority, randomised, controlled trial. *Lancet Infect Dis*. 2015 Aug;15(8):898-904
34. Sutter RW, John TJ, Jain H, Agarkhedkar S, Ramanan PV, Verma H, Deshpande J, Singh AP, Sreevatsava M, Malankar P, Burton A, Chatterjee A, Jafari H, Aylward RB. Immunogenicity of bivalent types 1 and 3 oral poliovirus vaccine: a randomised, double-blind, controlled trial. *Lancet*. 2010 Nov 13;376(9753):1682-8.
35. PolioEradication. (Available from: <http://www.polioeradication.org/>)
36. Oostvogel PM, Rumke HC, Conyn-Van Spaendonck MA, van der Avoort HG, Leeuwenburg J, van Loon AM. Poliovirus circulation among schoolchildren during the early phase of the 1992-1993 poliomyelitis outbreak in The Netherlands. *J Infect Dis*. 2001 Dec 1;184(11):1451-5
37. Arya A. Outbreak of poliomyelitis in Albania and neighboring countries in 1996. *J Clin Microbiol*. 1999 Jan;37(1):276
38. 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.
39. Ministero della Salute. Vaccinazioni e profilassi. (Available from: http://www.salute.gov.it/portale/temi/p2_5.jsp?lingua=italiano&area=Malattie%20infettive&menu=vaccinazioni)
40. Patti A.M., Santi A.L., Vulcano A., Casagni L., Lamberti A., De Stefano Caraffa D., Vellucci L., Fiore L., Fara G.M. Surveillance of poliomyelitis in Italy: immunity status of population against polio and environmental circulation of Poliovirus. General illustration of the results. 2002. *Ann. Ig.* 14(4 Suppl 5):1-57.41
41. WKLY. Poliomyelitis in Tajikistan: first importation since Europe certified polio-free. *Wkly Epidemiol Rec*. 2010 Apr 30;85(18):157-8.

42. Patti A.M. From the goal of the global polio eradication to the recent epidemics: reflections on the present epidemiological situation and future perspectives. 2010. *Ann Ig.* 22(6):521-37
43. Yakovenko ML, Gmyl AP, Ivanova OE, Eremeeva TP, Ivanov AP, Prostova MA, Baykova OY, Isaeva OV, Lipskaya GY, Shakaryan AK, Kew OM, Deshpande JM, Agol VI. The 2010 outbreak of poliomyelitis in Tajikistan: epidemiology and lessons learnt. *Euro Surveill.* 2014 Feb20;19(7):20706
44. Khetsuriani N, Pallansch MA, Jabirov S, Saparova N, Oberste MS, Wannemuehler K, Ursu P, Wassilak S, Martin R. Population immunity to polioviruses in the context of a large-scale wild poliovirus type 1 outbreak in Tajikistan, 2010. *Vaccine.* 2013 Oct 1;31(42):4911-6
45. Eichner M, Brockmann SO. Polio emergence in Syria and Israel endangers Europe. *Lancet.* 2013 Nov 30;382(9907):1777.
46. Pellegrinelli L, Primache V, Fiore L, Amato C, Fiore S, Bubba L, Pariani E, Amendola A, Barbi M, Binda S. Surveillance of acute flaccid paralysis (AFP) in Lombardy, Northern Italy, from 1997 to 2011 in the context of the national AFP surveillance system. *Hum Vaccin Immunother.* 2015;11(1):277-81. Erratum in: *Hum Vaccin Immunother.* 2015;11(7):1880.
47. Asghar H, Diop OM, Weldegebriel G, Malik F, Shetty S, El Bassioni L, Akande AO, Al Maamoun E, Zaidi S, Adeniji AJ, Burns CC, Deshpande J, Oberste MS, Lowther SA. Environmental surveillance for polioviruses in the Global Polio Eradication Initiative. *J Infect Dis.* 2014 Nov 1;210 Suppl 1:S294-303.
48. Pellegrinelli L, Binda S, Chiaramonte I, Primache V, Fiore L, Battistone A, Fiore S, Gambino M, Bubba L, Barbi M. Detection and distribution of culturable Human Enteroviruses through environmental surveillance in Milan, Italy. *J Appl Microbiol.* 2013 Nov;115(5):1231-9
49. World Health Organization. Guidelines for environmental surveillance of poliovirus circulation-WHO/V&B/03.03.(Available from: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/67854/1/WHO_V-B_03.03_eng.pdf)
50. Battistone A, Buttinelli G, Fiore S, Amato C, Bonomo P, Patti AM, Vulcano A,

- Barbi M, Binda S, Pellegrinelli L, Tanzi ML, Affanni P, Castiglia P, Germinario C, Mercurio P, Cicala A, Triassi M, Pennino F, Fiore L. Sporadic isolation of sabin-like polioviruses and high-level detection of non-polio enteroviruses during sewage surveillance in seven Italian cities, after several years of inactivated poliovirus vaccination. *Appl Environ Microbiol.* 2014 Aug;80(15):4491-501.
51. Kilpatrick DR, Iber JC, Chen Q, Ching K, Yang SJ, De L, Mandelbaum MD, Emery B, Campagnoli R, Burns CC, Kew O. Poliovirus serotype-specific VP1 sequencing primers. *J. Virol. Methods* 2011. 174:128–130
 52. Fiore L, Novello F, Simeoni P, Amato C, Vellucci L, De Stefano D, Grandolfo ME, Luzzi I. Surveillance of acute flaccid paralysis in Italy: 1996-1997. AFP Study Group. *Acute flaccid paralysis. Eur J Epidemiol.* 1999 Sep;15(8):757-63.
 53. Angelillo IF, Pavone L, Rito D. Acute flaccid paralysis surveillance in Southern Italy. *Public Health.* 2001 Mar;115(2):130-2
 54. Prato R, Labianca M, Calvario A, Bozzi A, Rizzo C, Fiore L, Vellucci L, Buttinelli G, Donati V, Lopalco PL, Germinario C. Evaluation of the Surveillance System of Acute Flaccid Paralysis in Puglia: 5 years of work. *Ann Ig.* 2002 Nov-Dec;14(6):487-94
 55. D'Errico MM, Barbadoro P, Bacelli S, Esposito E, Moroni V, Scaccia F, Tantucci L, Prospero E; AFP Study Group. Surveillance of acute flaccid paralysis in the Marches region (Italy): 1997-2007. *BMC Infect Dis.* 2008 Oct 9;8:135
 56. de Oliveira Pereira JS, da Silva LR, de Meireles Nunes A, de Souza Oliveira S, da Costa EV, da Silva EE. Environmental Surveillance of Polioviruses in Rio de Janeiro, Brazil, in Support to the Activities of Global Polio Eradication Initiative. *Food Environ Virol.* 2015 [Epub ahead of print]
 57. Manor Y, Shulman LM, Kaliner E, Hindiyeh M, Ram D, Sofer D, Moran-Gilad J, Lev B, Grotto I, Gamzu R, Mendelson E. Intensified environmental surveillance supporting the response to wild poliovirus type 1 silent circulation in Israel, 2013. *Euro Surveill.* 2014 Feb 20;19(7):20708.
 58. Marx A1, Glass JD, Sutter RW. Differential diagnosis of acute flaccid paralysis and its role in poliomyelitis surveillance. *Epidemiol Rev.* 2000;22(2):298-316.

59. Antona D, Lévêque N, Chomel JJ, Dubrou S, Lévy-Bruhl D, Lina B. Surveillance of enteroviruses in France, 2000-2004. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2007 Jun;26(6):403-12
60. Costan-Longares A., Moce´-Llivina L., Avellon A., Jofre J. and Lucena F. Occurrence and distribution of culturable Enteroviruses in wastewater and surface waters of north-eastern Spain. *Journal of Applied Microbiology*, 2008. Dec;105(6):1945-55
61. Bubba L., Pellegrinelli L., Pariani E., Priamche V., Amendola A., Binda S. A novel multiplex one-step real-time RT-PCR assay for the simultaneous identification of enterovirus and parechovirus in clinical fecal samples. *J prev med hyg* 2015; 56: E57-E60
62. Siafakas N, Goudesidou M, Gaitana K, Gounaris A, Velegraki A, Pantelidi K, Zerva L, Petinaki E. Successful control of an echovirus 6 meningitis outbreak in a neonatal intensive care unit in central Greece. *Am J Infect Control*. 2013 Nov;41(11):1125-8
63. Bina Rai S, Wan Mansor H, Vasantha T, Norizah I, Chua KB. An outbreak of echovirus 11 amongst neonates in a confinement home in Penang, Malaysia. *Med J Malaysia*. 2007 Aug;62(3):223-6.
64. Khetsuriani N, Kutateladze T, Zangaladze E, Shutkova T, Peñaranda S, Nix WA, Pallansch MA, Oberste MS. High degree of genetic diversity of non-polio enteroviruses identified in Georgia by environmental and clinical surveillance, 2002-2005. *J Med Microbiol*. 2010 Nov;59(Pt 11):1340-7
65. Heim A. From poliovirus surveillance to enterovirus surveillance: a complete picture? *J Med Microbiol*. 2005 Jan;54(Pt 1):1-2.
66. Savolainen-Kopra C, Paananen A, Blomqvist S, Klemola P, Simonen ML, Lappalainen M, Vuorinen T, Kuusi M, Lemey P, Roivainen M. A large Finnish echovirus 30 outbreak was preceded by silent circulation of the same genotype. *Virus Genes*. 2011 Feb;42(1):28-36