

INFLUENZA

Simone Lanini
Silvia Pittalis
Francesco Maria Fusco
Concetta Castilletti
Antonino Di Caro
Maria Rosaria Capobianchi
Eleonora Lalle
Francesco Nicola Lauria
Giuseppe Ippolito
Vincenzo Puro

1. INTRODUZIONE

Il termine influenza si riferisce ad una sindrome clinica che colpisce mammiferi ed uccelli a seguito dell'infezione da parte di un gruppo di *Orthomixovirus*, i virus influenzali [1].

Vista la diversità degli ospiti suscettibili, l'estrema mutevolezza del virus e la variabilità dei quadri clinici, che i differenti ceppi (*strain*) causano nell'ospite animale, numerose definizioni sono usate in maniera intercambiabile e spesso ambigua. Per tale motivo si ritiene opportuno fornire una definizione univoca di alcuni termini che verranno usati in questo capitolo.

1.1. Definizioni

Virus influenzali [2], con questo termine si identificano 3 differenti generi appartenenti alla famiglia *Orthomixoviridae*:

1. virus influenzali A, capaci di infettare numerose specie di uccelli e mammiferi, incluso l'uomo, responsabili di pandemie nel corso della storia; un ceppo A è di norma il ceppo dominante nel periodo inter pandemico;
2. virus influenzali B, capaci di infettare uomo e foche, rispondono di un ristretto numero di casi di sindrome influenzale durante il periodo inter pandemico;
2. virus influenzali C, capaci di infettare uomo e maiali, sono causa di epidemie locali, specie in bambini, rispondono di un piccolo numero di casi di sindrome influenzale durante il periodo inter pandemico.

Influenza stagionale o epidemica [3], con questo termine si fa riferimento alle epidemie umane che regolarmente si verificano nella metà più fredda dell'anno nei 2 rispettivi emisferi. L'influenza epidemica è una patologia a decorso benigno nell'ospite sano immunocompetente, causa però un notevole numero di decessi in speciali

gruppi di popolazione come gli anziani, i soggetti con patologie cardio-polmonari, i soggetti immunodepressi e gli infanti.

Le epidemie stagionali, per quanto a bassa letalità, rispondono di una mortalità bruta complessiva di 100.000-500.000 morti/anno a livello mondiale. Sono responsabili delle epidemie influenzali un ristretto numero di ceppi appartenenti ai sottotipi (*subtype*) H1, H2, H3 e N1, N2 di influenza A e in misura trascurabile ceppi virali di influenza B e C.

Virus dell'Influenza umana, con tale termine si definiscono tutti i virus influenzali già noti per essersi ben adattati all'ospite umano:

1. virus A influenzali: endemici nell'uomo, attualmente rispondono a questa definizione solo i ceppi virali H3N2 (attuale ceppo dominante e causa dell'ultima pandemia influenzale nel 1967), H2N2 (causa della pandemia del 1957) e H1N1 (causa della pandemia del 1918);
2. virus B influenzali;
2. virus C influenzali.

Virus dell'Influenza Aviaria [4], con questo termine si identificano tutti i ceppi virali di influenza A noti per dare malattia negli uccelli, indipendentemente dalla loro capacità di infettare l'uomo. A seconda della letalità che ciascun ceppo manifesta nei polli vengono distinti 2 gruppi:

1. virus aviari a bassa patogenicità (LPAI), causa di un'infezione sub-clinica negli uccelli selvatici e di malattia lieve o moderata nei polli;
2. virus aviari ad alta patogenicità (HPAI), causa di malattia da moderata a letale negli uccelli selvatici e quasi sempre letale nei polli.

Storicamente gli HPAI sono ceppi appartenenti al sottotipo H5 o H7. Essendo gli uccelli il *réservoir* naturale di tutti i sottotipi virali H ed N, virtualmente tutti i

ceppi di influenza A possono essere considerati di origine aviaria.

Influenza aviaria, con questo termine si identificano le differenti sindromi cliniche che si osservano in uccelli e in mammiferi (uomo incluso) dopo essere stati infettati da ceppi virali adattati agli uccelli. Termini come influenza umana (*human-flu*), influenza suina (*swine-flu*) e simili si riferiscono ad infezioni causate da ceppi virali ben adattati alla specie animale specificata.

Virus dell'influenza pandemica, con tale termine si identifica un virus ben adattato all'uomo che presenti caratteristiche tali da renderlo capace di generare una nuova pandemia. Le caratteristiche essenziali che tale ceppo deve necessariamente presentare sono:

1. capacità di infettare e replicarsi efficientemente nell'organismo umano;
2. determinanti antigenici maggiori per cui non esista apprezzabile memoria immunitaria nella popolazione mondiale;
3. capacità di essere facilmente trasmissibile da uomo a uomo;
4. alta patogenicità per l'ospite umano.

Come suggerito dalle precedenti pandemie, il miglior candidato a diventare un virus pandemico sarebbe un virus influenzale A ad alta patogenicità, mutante o riassortante, di origine aviaria. Ad oggi il virus che è ritenuto possedere il maggior potenziale per dar vita ad un ceppo pandemico sembra essere l'HPAI H5N1, detto *Asian lineage*.

Influenza pandemica o pandemia influenzale, con questi termini si intende un'epidemia influenzale su larga scala causata da un ceppo di influenza A ben adattato all'uomo e per il quale la popolazione generale non possiede memoria immunitaria verso i determinanti antigenici maggiori; pertanto questo virus sarebbe caratterizzato da un elevato tasso di attacco e alta letalità. Nel corso della storia le pandemie sono state causate da ceppi virali di origine

aviaria, adattatisi all'uomo a seguito di riassortimento o di mutazione genica tale da consentire il salto di specie [5].

Periodi epidemici [6], con il termine di periodo pandemico si identifica uno dei tre stadi principali con cui l'OMS classifica l'attività di un particolare ceppo virale a potenziale pandemico nei confronti della popolazione umana (Tabella 1):

1. periodo interpandemico: è definito periodo interpandemico la situazione in cui non sia segnalato nessuna infezione umana da parte di virus influenzali A con potenziale pandemico;
2. periodo di allerta pandemica: è definito periodo di allerta pandemica la situazione in cui sono segnalati casi sporadici di infezione umana da parte di virus influenzali A con potenziale pandemico ma che tuttavia non sia stata ancora segnalata trasmissione interumana efficiente e sostenuta;
3. periodo pandemico: è definito periodo pandemico la situazione in cui un virus con potenziale pandemico sia completamente adattato all'uomo.

Fasi pandemiche [6], con questo termine si identificano le sotto classificazioni in cui sono suddivisi i tre periodi pandemici. In particolare l'OMS prevede (Tabella 1):

1. due fasi per il periodo interpandemico, a basso ed alto rischio di trasmissione all'uomo (fase 1 e 2);
2. tre fasi per il periodo di allerta pandemica, a secondo dell'efficienza della trasmissione interumana, (fase 3, 4 e 5);
3. una sola fase per il periodo pandemico (fase 6).

La Tabella 1 riassume le definizioni di periodi e fasi pandemiche elaborate dall'OMS, una revisione attualmente (ottobre 2008) in corso di discussione.

Il piano nazionale di preparazione e risposta ad una pandemia influenzale è

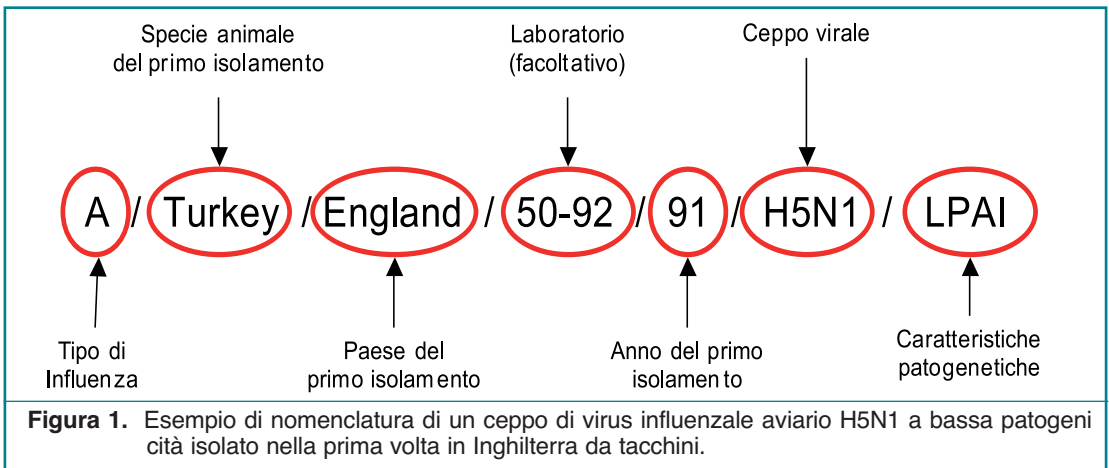
Tabella 1 ■ OMS. PERIODO E FASI PANDEMICHE. ADATTATO DA OMS EPIDEMIC AND PANDEMIC ALERT AND RESPONSE (EPR)

Periodo pandemico		Fasi pandemiche	
Periodo	Epidemiologia nell'uomo	Fasi	Epidemiologia nell'uomo
Periodo interpandemico	Nessuna infezione umana	Fase 1	Basso rischio di infezione nell'uomo
		Fase 2	Alto rischio di infezione nell'uomo
Periodo di allerta pandemica	Infezioni umane sporadiche	Fase 3	Assenza o rari casi di trasmissione interumana
		Fase 4	Trasmissione interumana in aumento
		Fase 5	Significativa trasmissione interumana
Periodo pandemico	Infezioni umane comuni	Fase 6	Trasmissione interumana efficiente e sostenuta

Fonte: [6]

disponibile in rete (http://www.pandemia.it/pdf/PIANO_PANDEMICO.pdf); il piano pandemico regionale elaborato per il Lazio è stato approvato con Deliberazione della

Giunta Regionale 24 aprile 2008, N.302 e pubblicato sul "Bollettino Ufficiale" supplemento ordinario N.90 al "Bollettino Ufficiale" N.28 del 28 luglio 2008.



2. AGENTE EZIOLOGICO

I virus influenzali A, B e C, responsabili di malattia nell'uomo e in altri mammiferi, sono tre generi appartenenti alla famiglia *Orthomyxoviridae*, distinti sulla base delle differenze nei determinanti antigenici maggiori (emoagglutinina e neuroaminidasi).

La nomenclatura dei virus influenzali è determinata per convenzione in base al tipo influenzale, specie animale di provenienza, luogo e anno di isolamento, determinati antigenici maggiori e virulenza [7]. Un esempio è mostrato nella Figura 1 (v. pag. 101).

I virus influenzali sono tutti virus rivestiti il cui genoma è costituito da 7-8 filamenti di RNA a polarità negativa. Nel complesso i virioni maturi sono costituiti da 10 proteine 8 delle quali strutturali (Figura 2).

Le proteine PB1, PB2 e PA sono componenti della polimerasi virale (RNAd-RNAP) e vengono codificate da tre sementi differenti; il gene che codifica per PB ospita un ORF che codifica per la proteina non strutturale PB2-FP, coinvolta nell'interferenza

con i sistemi cellulari.

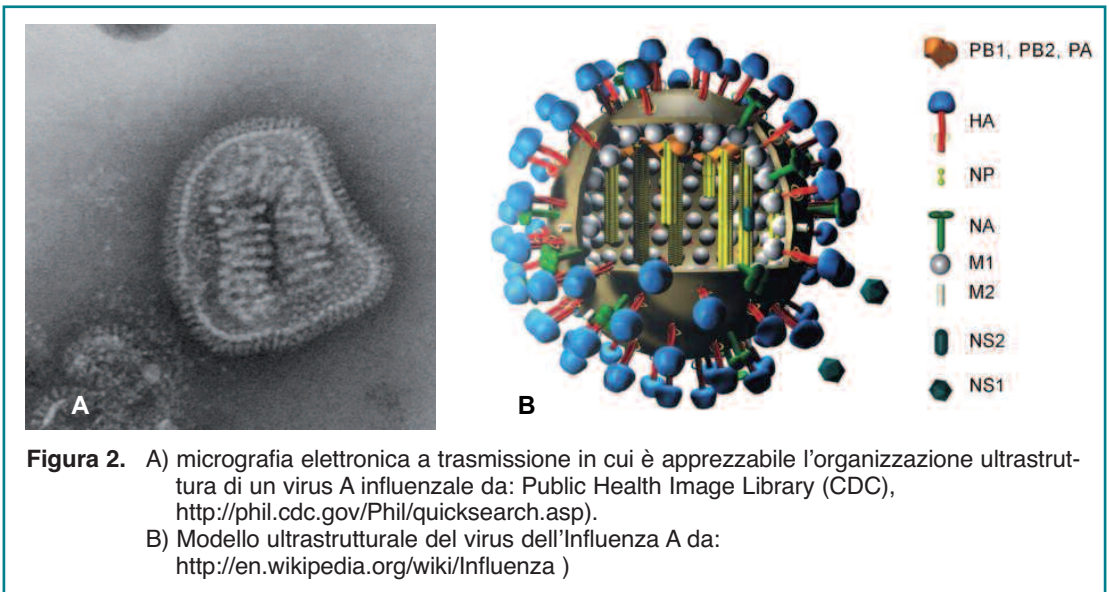
L'emoagglutinina (H) è il ligando del recettore cellulare e viene codificata da un singolo segmento di RNA, la sua attività consiste nel legame dei residui di acido sialico (SA) espressi in alcune glicoproteine cellulari; mediante la formazione di trimeri ha anche funzione di complesso di fusione.

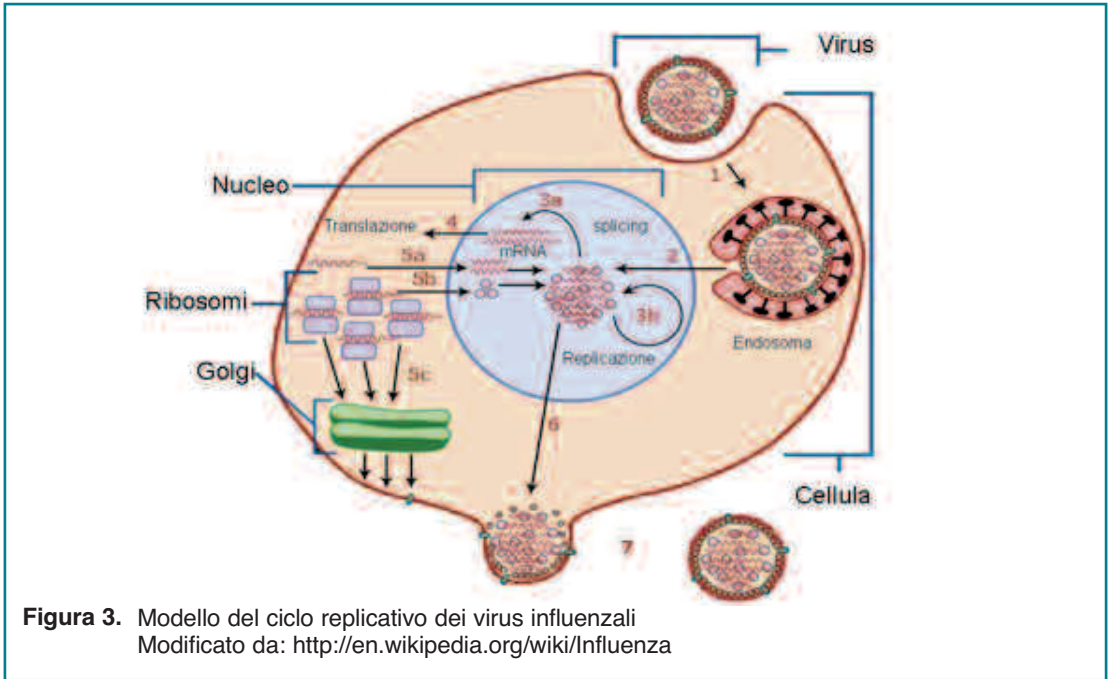
La proteina del nucleocapside (NP) è la proteina strutturale che lega e stabilizza i segmenti di ssRNA.

La neuroaminidasi (N) è, nella sua forma matura, un omotetramero ad attività aminidasica che cliva i residui di SA a cui si lega la nascente progenie virale subito dopo la gemmazione.

Le proteine di matrice (M1 ed M2) vengono codificate dallo stesso segmento di RNA, M1 costituisce la matrice, M2 funziona da canale ionico che garantisce il mantenimento di un pH idoneo all'interno dell'endosoma contenente il virus subito dopo la penetrazione nella cellula.

Le proteine non strutturali NS1 ed NS2 sono codificate dallo stesso segmento di RNA: NS1 è un inibitore della sintesi degli





mRNA cellulari; per NS2 si presume un ruolo nelle fasi di assemblaggio dei virioni.

I virus influenzali B e C differiscono dal virus A per l'assenza della proteina M2; il virus C inoltre presenta, al posto delle componenti H ed N, un polimero proteico detto emagglutin-esterasi (HE) con le funzioni sia di ligando che di amidasi.

Il ciclo replicativo del virus è illustrato nella Figura 3 e di seguito sommariamente descritto.

Il primo evento della replicazione virale è costituito dall'adesione della proteina H al residuo di acido sialico espresso sulle glicoproteine della cellula ospite, tipicamente a livello delle vie aeree nei mammiferi o nell'intestino degli uccelli [8]. A seguito di questo evento la cellula internalizza la particella virale attraverso un processo attivo di endocitosi a cui fa seguito la formazione di un endosoma (1). Grazie all'ambiente acido presente all'interno dell'endosoma la proteina H promuove la fusione dell'enve-

lope virale con la membrana dell'endosoma liberando nel citoplasma l'RNA virale (vRNA), la polimerasi ed alcune proteine accessorie (2) [9].

Dopo la liberazione i segmenti di vRNA si complessano con la polimerasi e le altre proteine accessorie e vengono trasportati nel nucleo cellulare dove ha inizio la trascrizione di mRNA complementari a senso positivo (3a e 3b) che vengono successivamente esportati nel citoplasma [10]. Una volta nel citoplasma, parte del trascritto viene ri-trasportato indietro verso il nucleo per la trascrizione di nuovo vRNA genomico a senso negativo (5a) mentre un'altra parte lega i ribosomi per la produzione delle proteine virali. Le catene amminoacidiche prodotte dalla traduzione degli mRNA per le proteine H e N vengono inviate al complesso di Golgi dove sono glicosilate ed in seguito integrate nella membrana cellulare mentre tutte le altre proteine vengono ri-trasportate nel nucleo dove si

legano con i vRNA della progenie (5b) [11]. Una volta assemblati nel nucleo le nuove particelle virali ancora prive di *envelope* sono trasportate nel citoplasma dove legano i complessi di proteine H-N già integrati nella membrana cellulare, in questo modo il virus viene liberato nell'ambiente per gemmazione (6) [12]. Tuttavia, a causa dell'interazione della proteina H con i residui di acido sialico espressi sulla superficie cellulare che precedentemente avevano favorito l'ingresso, il virus resterebbe adeso alla superficie esterna della cellula ospite se non fosse per l'azione della proteina N che, clivando il legame, libera definitivamente il virione maturo nell'ambiente (7) [8].

Nel suo complesso il processo di replicazione sovrverte radicalmente il metabolismo cellulare e conduce la cellula ospite alla morte.

I virus influenzali, grazie alle loro caratteristiche strutturali ed alla documentata possibilità che differenti ceppi virali infettino una medesima cellula, riconoscono due differenti modalità di mutazione [13].

Il primo meccanismo è noto con il nome di *drift* antigenico. Dal momento che non esiste un meccanismo di correzione nel corso della trascrizione dei nuovi segmenti di RNA, la polimerasi virale produce in media 1 errore ogni 10 Kb, ed essendo 10 Kb anche la lunghezza dell'intero genoma virale si può concludere che ogni nuovo virione maturo prodotto è, *per se*, un mutante [14]. Il *drift* è in genere responsabile delle mutazioni minori dei ceppi virali nei periodi interpandemici, ma talvolta può indurre mutazioni antigeniche maggiori, come quella che nel 1918 fece insorgere il ceppo pandemico H1N1 della *Spagnola*.

Il secondo meccanismo è noto con il nome di *shift* antigenico e può avvenire quando differenti ceppi virali infettano contemporaneamente una stessa cellula. In questo caso si assiste alla ricombinazione dei segmenti genetici propri dei diversi ceppi virali che, mescolando i propri corre-

di genetici, vengono a formare un ceppo virale del tutto nuovo. Questo meccanismo è alla base dei *salts di specie* ed è stato responsabile della pandemia del 1957 (*Asiatica*), della pandemia del 1968 (*Hong Kong*) e della pseudo-pandemia del 1976 (*Russa*).

3. PATOGENESI

La patogenicità e la virulenza dei ceppi influenzali A dipendono dalla coesistenza di caratteristiche genotipiche e fenotipiche, tali che un determinato ceppo sia in grado di infettare un organismo ospite, replicarsi efficacemente all'interno dei tessuti ed evadere la risposta immunitaria.

In genere i ceppi aviari di influenza vivono all'interno dei loro ospiti naturali (gli uccelli selvatici) senza determinare patologia evidente (dal punto di vista molecolare c'è un basso rapporto N/S *non-synonymous vs. synonymous mutations*), il che si traduce epidemiologicamente in alta epidemia con bassa o nulla letalità [15].

In particolare, è stato documentato che ceppi LPAI (a bassa patogenicità) sono in grado di replicarsi esclusivamente nell'epitelio intestinale degli uccelli, mentre i ceppi HPAI sembrano caratterizzati da tropismo ubiquitario e dalla capacità di essere escreti a lungo anche dopo la fine dello stato di malattia con le deiezioni e le secrezioni respiratorie [16].

Alcune particolari situazioni sembrano essere correlate alla trasformazione di ceppi LPAI in ceppi HPAI.

Un primo meccanismo prevede la *mutazione del sito di clivaggio della proteina H* [16]. La proteina H è sintetizzata come precursore (H₀), in seguito clivato da proteasi cellulari nella forma attiva H_{1,2}, (un dimero formato da due catene peptidiche legate da legami covalenti disolfuro). Nei ceppi LPAI i siti di clivaggio possono essere idrolizzati solo da proteasi specifiche contenute nell'epitelio broncopolmonare o gastro-

enterico, ma, a seguito di mutazioni che comportano l'inserimento di residui aminoacidici basici nel sito di clivaggio, la proteina H0 risulta suscettibile all'idrolisi da parte di proteasi aspecifiche ubiquitarie. In tal modo, mentre i ceppi LPAI sono *ristretti* per tessuto, i ceppi LPAI acquisiscono un tropismo ubiquitario e possono invadere l'intero organismo ospite.

Un secondo meccanismo consiste in *mutazioni della polimerasi virale* [17]. In alcuni ceppi HPAI è stata documentata la presenza di un piccolo ORF, a carico del gene della PB1, che genera una proteina non strutturale, PB1-F2, che potrebbe avere un ruolo nel processo di apoptosi delle cellule infettate. La sostituzione in 627 di un residuo di glutammato con un residuo di lisina avrebbe inoltre un ruolo importante nella patogenesi di ceppi aviari nei mammiferi: nel corso dell'epidemia occupazionale da H7N7 del 2003 in Olanda, solo il virus portatore di questa mutazione fu responsabile dell'unico caso letale [18]. Infine in modelli animali è stato dimostrato che la sostituzione in posizione 627 della PB2 di un residuo di aspartato con un residuo di asparagina rende i ceppi H5N1 aviari capaci di diffondersi con maggiore efficienza tra i felini [19].

Un terzo meccanismo sembra sia dovuto all'interferenza di alcune *varianti della proteina NS1* con l'attività del sistema degli interferoni. In particolare è stato dimostrato che solo i ceppi HPAI (H5N1) contengono un residuo di acido glutammico in posizione 92 [20]. È stato dimostrato in modelli murini che l'inserimento dei geni NS di ceppi HPAI(H5N1) in ceppi virali non patogeni risulta in un riassortante genico letale, verosimilmente per la conseguente disregolazione citochinica (*tempesta citochinica*) [21].

4. VIE DI TRASMISSIONE ED EPIDEMIOLOGIA

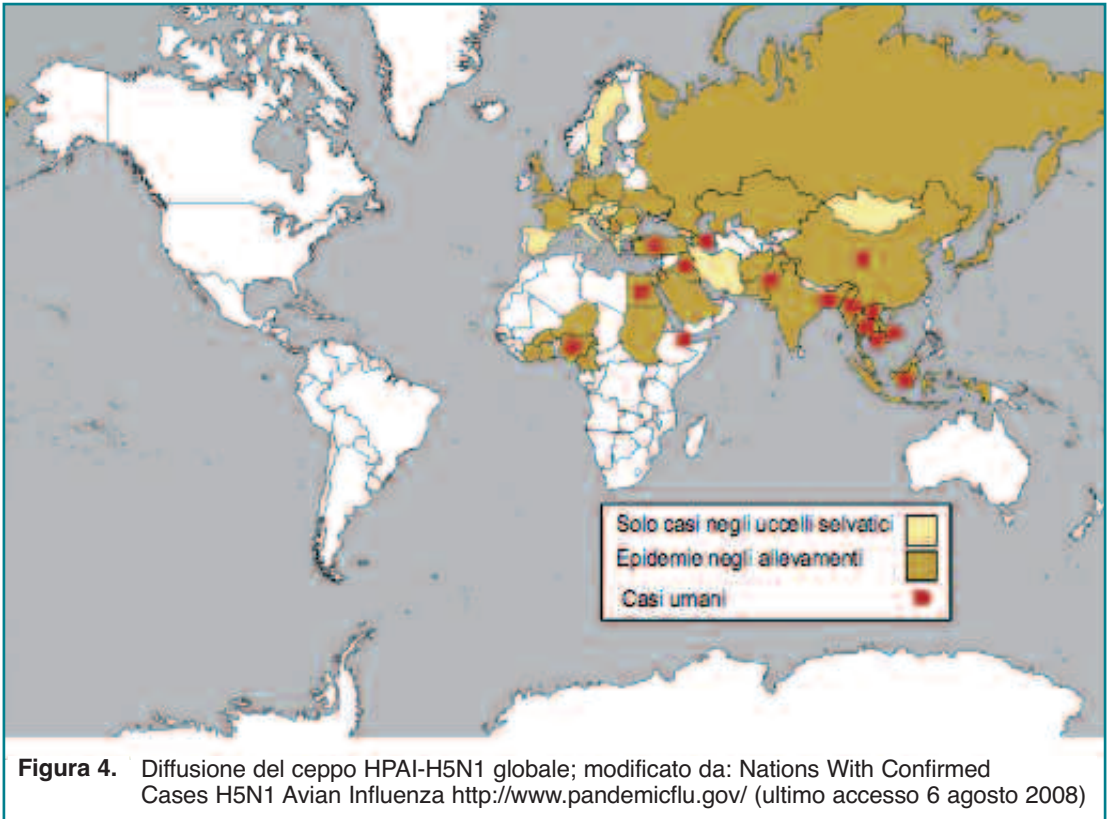
I ceppi influenzali A umani si trasmettono efficientemente da uomo a uomo mediante

contatto indiretto e *droplet*, mentre non esiste accordo sulla possibilità di trasmissione per via aerea propriamente detta [22].

A differenza dei ceppi aviari con recettori di ingresso (H) maggiormente affini per i residui SA gal-2,3, i virus influenzali umani hanno recettori di ingresso (H) affini ai residui SA-gal 2,6 espressi sull'epitelio delle alte vie aeree dove, generalmente, ha luogo l'infezione primaria [23]. Benché le differenze di specificità recettoriale tra ceppi virali adattati a specie animali differenti renda infrequente la possibilità che l'uomo si infetti con ceppi non umani, la trasmissione di ceppi aviari all'uomo è stata segnalata in diverse occasioni a seguito di casi di esposizione massiva a materiali contaminati [24]. Alla base della trasmissione di ceppi di influenza aviaria all'uomo sembrano essere la presenza di residui SA gal-2,3 affini al recettore di ingresso (H) dei ceppi aviari sulle cellule dell'epitelio alveolare umano [25] e, probabilmente, caratteristiche genetiche dell'ospite favorenti, come sarebbe dimostrato dalla presenza di *cluster* familiari che coinvolgono quasi esclusivamente consanguinei [26].

Benché sia un evento raro, la possibilità che virus aviari possano essere trasmessi all'uomo suscita notevoli preoccupazioni per quanto riguarda la selezione di nuovi ceppi influenzali a potenziale pandemico. Storicamente alla base della selezione dei mutanti pandemici sono stati meccanismi di graduale adattamento all'ospite umano di un particolare ceppo aviario (*drift*) o meccanismi di ricombinazione genetica tra ceppi virali differenti (*shift*), eventi entrambi favoriti dalla trasmissione di ceppi aviari all'uomo [27].

Un altro timore per lo sviluppo di un riassortante umano-aviario a potenziale pandemico è riconosciuto nelle epidemie che si verificano in allevamenti misti di polli e di maiali. I suini, infatti, per la presenza contemporanea dei recettori SA gal-2,3 e gal-2,6 sull'epitelio delle alte vie aeree



sono contemporaneamente suscettibili all'infezione di ceppi influenzali aviari ed umani, il che rende questo animale ideale alla produzione di riassortanti umano-aviani a potenziale pandemico [28].

Attualmente il ceppo aviario che rappresenta il rischio maggiore per la salute umana sembra essere il ceppo HPAI-H5N1 identificato come *Asian lineage*. Il primo segno che H5N1 potesse costituire un serio pericolo per la salute umana si ebbe nel 1997 ad Hong Kong: 18 persone furono infettate, 6 di esse morirono. L'epidemia venne controllata con l'abbattimento di 1,5 milioni di polli nella sola area di Hong Kong. Dopo i casi del 1997 non si sono verificati ulteriori casi umani fino al 2003, ma sembra che nel corso di

questo periodo il ceppo abbia acquisito uno status enzootico tra gli uccelli selvatici in Estremo Oriente. Dal 2003 ad oggi il virus è stato identificato sia in uccelli selvatici che all'interno di allevamenti avicoli, dove ha causato estese epidemie, in Europa, Asia e Africa.

Inoltre, un non trascurabile numero di casi umani, gravato da alti tassi di letalità, è stato riportato in alcuni Paesi asiatici ed africani. In Figura 4 viene riportata la diffusione globale del virus mentre il numero complessivo dei casi umani suddivisi per Paese ed anno di insorgenza è consultabile all'indirizzo http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/country/en.

Nel corso della storia recente, comunque, H5N1 non è stato l'unico responsabile

di casi umani. Infatti anche ceppi appartenenti al sottotipo H7 sono stati coinvolti in epidemie umane tra cui:

1. un'epidemia in Olanda nel 2003 sostenuta da un ceppo HPAI H7N7 che coinvolse 89 persone, 86 lavoratori dell'industria del pollame e 3 contatti (familiari dei lavoratori) causando un decesso e suggerendo una possibile trasmissione interumana [29, 30];
2. un singolo caso di infezione grave da H7N2 nello stato di New York nel 2003 [31];
3. due casi di congiuntivite nel 2004 in Canada sostenuti da un ceppo H7N3 [32];
4. un caso di congiuntivite da LPAI H7N3 nel Regno Unito nel 2006 [33];
5. quattro casi confermati di infezione da LPAI H7N2 nel Regno Unito nel 2007 [34];

In particolare, recenti evidenze scientifiche sembrano dimostrare che ceppi appartenenti al sottotipo H7, che circola attualmente tra le popolazioni di volatili del Nord America, stiano sviluppando una maggiore capacità di infettare l'uomo grazie ad una più elevata affinità per i recettori SA gal-2,6 [23].

Il ceppo H9N2 si è reso responsabile di 4 casi di sindrome influenzale in bambini ad Hong Kong, 2 nel 1999 [35], 1 nel 2003 [35] e 1 nel 2007 [36].

Il ceppo H10N7 è stato isolato nel 2004 in Egitto da due fratellini figli di un commerciante di pollame affetti da sindrome influenzale. [37].

Infine, studi sierologici di prevalenza hanno evidenziato la positività per anticorpi anti-H5 in lavoratori dell'industria del pollame in Italia [38] e Regno Unito [33] ed inoltre uno studio condotto su cacciatori di anatre e sui guardiacaccia dello Stato dell'Iowa (USA) ha dimostrato marcatori di pregresso contatto con ceppi aviari in molti dei soggetti testati. [39]

In generale si può osservare che le infezioni umane sono rappresentate frequentemente da casi isolati che colpiscono generalmente individui giovani. Tuttavia *cluster* di infezione riconducibili ad una comune esposizione ad animali infetti sono stati registrati in almeno 10 Paesi ed i soggetti coinvolti erano spesso consanguinei. La trasmissione interumana di ceppi aviari attualmente è considerata un evento eccezionale ed eventi in cui è stata ipotizzata una trasmissione da persona a persona sono stati descritti in sole 3 occasioni [29,40,41].

Attualmente il principale fattore di rischio per l'infezione da virus dell'influenza aviaria resta l'esposizione massiva a materiale di origine animale infetto ed in particolare sono da considerarsi pratiche a rischio:

1. macellare o preparare pollame infetto;
2. maneggiare galli da combattimento;
3. giocare con polli e/o papere (i palmipedi hanno spesso un'infezione asintomatica);
4. consumare carni di pollo o sangue di anatra non cotti,
5. esposizione a materiali infetti di origine animale o umana in laboratorio.

Di recente è stato condotto uno studio caso-controllo che dimostrava un'associazione positiva tra lo sviluppo di infezione e i seguenti fattori [42]:

1. preparare per il consumo polli malati o morti per l'infezione;
2. aver avuto nel proprio pollaio polli malati nei 7 giorni precedenti;
3. non avere una fonte d'acqua in casa.

In definitiva, si può asserire che in Occidente, generalmente, i casi di infezione con ceppi aviari hanno coinvolto solo i lavoratori dell'industria del pollame, mentre in Estremo Oriente è colpita la popolazione rurale, in particolare i bambini, maggiormente esposti al contatto con pollame spesso allevato in casa.

Né in Occidente né in Estremo Oriente sono mai stati segnalati casi di trasmissio-

ne nosocomiale di ceppi influenzali aviari; inoltre, nessuno degli studi sierologici condotti su operatori sanitari ha dimostrato un aumento della prevalenza di anticorpi contro antigeni aviari rispetto alla popolazione generale [43].

5. MANIFESTAZIONI CLINICHE

Il quadro clinico dei pazienti infettati con ceppi di influenza aviari varia in base al ceppo coinvolto [44].

I pazienti infetti da H5N1 *Asian lineage* presentano prevalentemente una sintomatologia polmonare e gastrointestinale, con febbre e, talora, congiuntivite. La sintomatologia più tipica dei pazienti che si presentano in ospedale a seguito di infezione da H5N1 è quella di una polmonite comunitaria: i sintomi insorgono tra i 2 ed gli 8 giorni dall'esposizione. Costante è la presenza di febbre e frequente la presenza di diarrea. La radiografia del torace evidenzia quadri vari di coinvolgimento del parenchima polmonare: infiltrato interstiziale; infiltrati globulari; consolidamento polmonare; segni di broncogramma aereo e pneumotorace. Spesso il pneumotorace si verifica a seguito di manovre di ventilazione meccanica. La popolazione coinvolta è in genere giovane, la letalità alta e si aggira intorno al 60%. Complicanze maggiori, che spesso determinano il decesso di questi pazienti, sono la sindrome da *distress* respiratorio acuto (ARDS, generalmente tra la 4° e la 13° giornata), la insufficienza multiorgano, la sindrome di Reye, emorragie polmonari ed encefalite.

In una recente casistica che descrive 26 casi ospedalizzati di polmonite da H5N1 viene segnalato che all'ingresso erano presenti: leucopenia nel 46% dei pazienti, linfopenia nel 62% e trombocitopenia nel 50%, tali reperti aumentavano per frequenza ed entità nel corso della prima settimana di degenza. Inoltre erano anche presenti ipertransaminesemia, iperglicemia, ipo-

albuminemia ed elevazione di CK, CPK ed LDH in circa la metà dei casi all'ingresso ed in quasi tutti i pazienti nel corso della prima settimana di degenza [45].

Indici prognostici sfavorevoli sono l'età avanzata, un lungo periodo sintomatico prima del ricorso alle cure mediche, la presenza di polmonite, leucopenia e linfopenia.

La Tabella 2 riassume i quadri clinici evidenziati nelle principali casistiche riportate in letteratura.

I reperti autoptici di alcuni pazienti deceduti per H5N1 mostravano danno multiorgano, coagulazione intravascolare disseminata e segni di necrosi ed atrofia del tessuto linfoide. Benché sia noto che il virus si replica preferibilmente a livello del tessuto polmonare che esprime il recettore SA gal 2,3, in corso di autopsia è stato possibile ritrovare il virus in tutti gli organi incluso il sistema nervoso centrale [46].

A differenza del ceppo H5N1 i sottotipi H7 causano quasi costantemente congiuntivite: nell'epidemia del 2003 in Olanda 82 degli 89 soggetti coinvolti presentavano congiuntivite, i restanti 7 una sindrome influenzale [29]. Un solo paziente sviluppò polmonite con ARDS seguita dal decesso [18].

Non esistendo un quadro sintomatico patognomonico che identifichi l'infezione umana da virus influenzali di origine aviaria, e non potendo prevedere le caratteristiche cliniche di ceppi mutanti, è essenziale raccogliere una storia anamnestica dei viaggi e del soggiorno dei pazienti nell'ultima settimana. La mappa continuamente aggiornata che indica l'attività dei virus aviari tra gli animali (dove sono riportate tutte le epizootie passate ed in corso) è consultabile sul sito http://www.oie.int/wahidprod/public.php?page=disease_outbreak_map.

L'aggiornamento in tempo reale della diffusione dei virus aviari nella popolazione umana è consultabile sul sito http://www.WHO.int/csr/disease/avian_influenza/en/index.html.

Tabella 2 ■ MANIFESTAZIONI CLINICHE AL TEMPO DELL'INGRESSO IN OSPEDALE DI QUATTRO DIFFERENTI CASISTICHE DI INFEZIONE DA H5N1

	TURCHIA- AZERBAIJAN 2006 [47]	EGITTO 2006-2007 [47]	INDONESIA 2005-2008 [48]	CINA 2005-2008 [45]
Num. Casi	16	38	127	26
Febbre	15(94%)	34 (89%)	100 (93%)	18 (69%)
Dispnea	7(44%)	14 (37%)	10 (9%)	6 (23%)
Tosse	12(80%)	27 (71%)	35 (32%)	20 (77%)
Rinorrea	2(14%)	-	17(17%)	1 (4%)
Vomito	-	3 (8%)	8 (7%)	3 (12%)
Diarrea	4 (29%)	2 (5%)	7(7%)	2 (8%)
Mialgia	4(27%)	17 (45%)	1 (1%)	8 (31%)
Mal di testa	7(47%)	19 (50%)	6 (6%)	4 (15%)

6. DIAGNOSI

La diagnosi di laboratorio nell'infezione da virus influenzale si basa, in fase acuta, sulla rilevazione dell'agente ed in fase di convalescenza sulla rilevazione di una risposta umorale e cellulare specifica.

La diagnosi di influenza aviaria deve comprendere sia test per la ricerca del virus specifico sia test per la ricerca di altri agenti infettivi tra i quali vanno considerati agenti virali (virus dell'influenza stagionale, *Metapneumovirus*, virus parainfluenzali 1, 2, e 3, virus respiratorio sinciziale, *Adenovirus*, *Enterovirus*, *Coronavirus* umani) e non virali (Clamidio, *C. burneti*, *M. pneumoniae*, *Legionella spp.*, *H. influenzae*).

Per l'esecuzione dei test virologici sono richiesti campioni respiratori in fase acuta (tampone faringeo, nasofaringeo, BAL) e 2 campioni di sangue con e senza anticoagulante in fase acuta ed in fase convalescente.

In caso di pazienti con elevato sospetto diagnostico di influenza aviaria e sintomatologia prevalentemente intestinale è consigliato l'invio anche di un campione di feci.

I campioni positivi per influenza A H5N1 vanno inoltre inviati, a cura del laboratorio, ad uno dei centri di riferimento indicati dall'OMS per la conferma dei risultati ottenuti.

La lista dei laboratori è disponibile all'indirizzo: http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/guidelines/referencelabs/en/index.html (ultimo accesso: 12/09/2008).

Le linee guida aggiornate sui test diagnostici sono consultabili sul sito dell'OMS all'indirizzo: http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/guidelinestopics/en/index.html (ultimo accesso: 12/09/2008).

6.1. Test rapido per la rilevazione degli antigeni influenzali

Sono attualmente disponibili test rapidi per la ricerca di antigeni influenzali. I test sono basati su sistemi di immunocromatografia e consentono di indicare se il paziente è affetto da influenza A senza tuttavia distinguere il ceppo virale. Circa l'impiego di questi test per la diagnosi di casi di influenza aviaria nell'uomo, l'OMS mette in

allerta sul fatto che i test rapidi sembrano avere una sensibilità ridotta su ceppi influenzali A H5N1 rispetto ai più comuni ceppi stagionali, pertanto qualora un soggetto presentasse un forte sospetto clinico, la sola negatività dei test rapidi non sarebbe sufficiente ad escludere l'infezione.

Presso l'INMI "L. Spallanzani", in fase sperimentale, i pazienti con sospetto di infezione da virus influenzale sono sottoposti a test rapido presso il servizio di accettazione e, indipendentemente dai risultati di tale test, si procede ad approfondimento diagnostico analizzando il campione respiratorio residuo del test che deve essere inviato al laboratorio insieme agli altri campioni.

Per i campioni pervenuti direttamente al laboratorio, senza preventiva esecuzione del test rapido, tale test è eseguito *in loco*.

6.2. Ricerca dell'agente mediante test di biologia molecolare

Sono disponibili test molecolari per la ricerca del RNA virali sia con metodologia convenzionale RT-PCR che in Real-Time RT-PCR (tempi di esecuzione 4-8 ore). Questo tipo di test può essere utilizzato sia per la diagnosi di influenza A che per la determinazione del ceppo virale coinvolto e può essere utilizzato sia per analizzare campioni prelevati in vivo che campioni provenienti da colture virali.

La procedura dell'INMI "L. Spallanzani" prevede che i test molecolari siano eseguiti preferenzialmente sul campione residuo raccolto per il test rapido.

In caso di sospetta influenza aviaria è necessaria la ripetizione del saggio su di un campione prelevato in un tempo o da una sede diversa dal primo, o la ripetizione del saggio con una diversa coppia di *primer*.

Il prodotto di amplificazione è inoltre caratterizzato con sequenziamento nucleotidico. Un risultato negativo dei test molecolari non esclude che il paziente abbia un'infezione da virus influenzale. Infatti, il

risultato dei test molecolari può essere negativo per bassa sensibilità del metodo impiegato o perché il campione esaminato non era idoneo per i tempi e le modalità con cui era stato raccolto.

6.3. Esami colturali

L'esame colturale può essere eseguito su uovo embrionato o su colture di cellule MDCK, questi test hanno costi elevati e lunghi tempi di esecuzione (2-10 giorni) ma hanno il vantaggio di rendere disponibile isolati virali per ulteriori analisi di caratterizzazione.

Nel caso di sospetta influenza aviaria, la procedura dell'INMI "L. Spallanzani" prevede che l'isolamento venga eseguito preliminarmente in ambiente controllato a livello 3 di biosicurezza su campioni aggiuntivi rispetto a quelli residui dei test rapidi. In casi particolari, soprattutto ai fini della diagnosi differenziale, è previsto anche lo studio morfologico in microscopia elettronica, sia sull'isolato che sul campione biologico iniziale.

Il virus eventualmente isolato viene identificato mediante RT-PCR e sequenziamento.

Anche per l'isolamento virale, un risultato negativo non esclude l'infezione. È inoltre, descritta la possibilità di co-infezione con altri virus respiratori, che va valutata attentamente in sede interpretativa.

6.4. Test immunologici

I test sierologici vengono in genere utilizzati per la diagnosi retrospettiva. Attualmente sono disponibili test per la ricerca di anticorpi specifici di differenti ceppi di virus di influenza A che si basano su sistemi di inibizione dell'emoagglutinazione e, soprattutto per la diagnosi differenziale, sui sistemi di fissazione del complemento. In condizioni ottimali, la diagnosi andrebbe eseguita sul saggio contemporaneo di due campioni prelevati il primo in fase acuta ed il secondo almeno 14 giorni dopo l'inizio

della sintomatologia. Per quanto riguarda la diagnosi di H5N1, l'OMS indica che deve essere considerata confermata la diagnosi retrospettiva di infezione nei seguenti casi:

1. nel caso si disponga dei 2 campioni prelevati a distanza di tempo siano soddisfatte entrambe le condizioni:
 - a. un titolo del siero prelevato a 14 giorni non inferiore a 1:80;
 - b. un incremento superiore a 4 volte del titolo di anticorpi anti-A(H5N1) tra il siero prelevato in fase acuta ed il siero a 14 giorni;
2. nel caso non si disponga dei 2 campioni prelevati a distanza di tempo si deve avere un titolo superiore a 1:80 in due test eseguiti sugli stessi campioni con tecniche differenti (il titolo deve essere superiore a 1:160 se si utilizza un test H5 specifico con Western-Blot o l'inibizione dell'emoagglutinazione con emazie di cavallo).

La procedura dell'INMI "L. Spallanzani" prevede che la ricerca degli anticorpi per H5N1 sia eseguita in combinazione con la ricerca di anticorpi per altri virus pneumotropi e, qualora possibile, su campioni prelevati in fase acuta ed in fase di convalescenza, mediante inibizione dell'emoagglutinazione e mediante fissazione del complemento. Nel caso in cui si riscontrasse positività per HPAI H5N1, i campioni sono confermati mediante microneutralizzazione.

Inoltre, è anche contemplata la possibilità di valutare la risposta cellulo-mediata su colture di linfomonociti dei pazienti esposti a preparazioni antigeniche specifiche. La rilevazione delle sottopopolazioni linfocitarie attivate è eseguita mediante rilevazione in citofluorimetria delle citochine intracitoplasmatiche.

6.5 Prelievo dei campioni

Pur non esistendo un accordo pieno sulle misure specifiche di sicurezza da adottare per il prelievo, la gestione e il trasporto di

campioni biologici potenzialmente infetti, il principio di precauzione impone l'adozione di misure idonee alla prevenzione della trasmissione da contatto, *droplet* e aerosol, specie quando le manovre utilizzate sono note determinare o aumentare la produzione di aerosol (raccolta di broncolavaggio alveolare, BAL) o *splash* (raccolta di tamponi delle alte vie aeree). Oltre a quanto prescritto dalle precauzioni standard, si ritiene opportuno che nella raccolta dei campioni respiratori, gli operatori sanitari indossino una protezione completa, comprensiva di filtro respiratorio FFP2 e tuta di *tyvek* o materiale sovrapponibile, e protezione degli occhi.

Le linee guida aggiornate sul prelievo e la gestione dei campioni in pazienti con sospetta infezione da virus influenzale di origine aviaria sono consultabili sul sito dell'OMS all'indirizzo: http://www.WHO.int/csr/disease/avian_influenza/guidelinstopics/en/index1.html (ultimo accesso: 12/09/2008).

Al fine di eseguire una corretta diagnosi bisogna tenere presente che sia i tempi di prelievo che la tipologia del campione inviato al laboratorio rivestono un ruolo importante.

Si distinguono i campioni biologici in 2 categorie.

Campioni di prima scelta:

1. Campioni delle alte vie aeree, utili per la diagnosi differenziale con ceppi di influenza stagionale:
 - a. tampone faringeo posteriore: è attualmente il campione delle alte vie aeree con il maggior potere diagnostico per influenza aviaria (H5N1) e rimane un ottimo campione per l'isolamento di ceppi stagionali;
 - b. tampone nasale (turbinato anteriore): risulta un ottimo campione per l'isolamento di ceppi stagionali; il potere diagnostico per ceppi aviari risulta scarso.

2. Campioni delle basse vie aeree: dato che i ceppi aviari sono spesso localizzati preferenzialmente a livello polmonare i campioni provenienti dalle basse vie aeree sono i migliori campioni per l'identificazione di ceppi aviari in corso di polmonite primaria, tuttavia data la maggiore invasività delle manovre di prelievo ed il conseguente aumento di rischio per pazienti ed operatori sono consigliati solo nel caso di paziente intubato (aspirato tracheale o bronco lavaggio).
3. Sangue: utile la raccolta di siero sia in fase acuta che di convalescenza. Al fine di dimostrare l'aumento del titolo anticorpale, un primo campione dovrebbe essere raccolto entro 7 giorni dalla comparsa dei sintomi ed un secondo in fase di convalescenza (3-4 settimane di distanza). Nel caso manchi il primo campione è comunque utile raccogliere un campione tra la seconda e la quarta settimana dall'insorgenza dei sintomi.

Campioni alternativi:

1. plasma in EDTA: utile per la ricerca di RNA virale;
2. tampone rettale: utile nei pazienti con diarrea;
3. *liquor* in caso di meningite.

In generale va ricordato che i campioni andrebbero prelevati prima dell'inizio della terapia anti-virale anche se non è ammissibile ritardare la somministrazione degli antivirali in attesa del prelievo dei campioni.

Per quanto riguarda i campioni respiratori va ricordato che il virus è presente nelle secrezioni respiratorie da un giorno prima dell'insorgenza dei sintomi per 2-3 settimane e che la massima escrezione di virus si ha nei primi 3 giorni di malattia pertanto i campioni andrebbero prelevati prima possibile.

In condizioni ottimali devono pervenire al laboratorio:

1. campione residuo del test rapido;
2. provette di siero in tempi differenti (la prima in fase di acuta e la seconda in fase di convalescenza);
3. eventuale ulteriore prelievo respiratorio;
4. eventuale campione di feci o tampone rettale.

Nella Tabella 3 sono riportati i campioni prelevati e le analisi di *routine* eseguite presso l'INMI "L. Spallanzani" in caso di sospetta influenza aviaria.

6.6. Trasporto dei campioni

I campioni di sangue vanno trasportati a temperatura ambiente, mentre i campioni respiratori e l'eventuale campione di feci vanno trasportati in condizioni di temperatura controllata (+4°C).

Nel caso in cui ci sia il sospetto di infezione da ceppi di influenza A HPAI il prelievo del materiale biologico da inviare e le modalità dell'invio dovranno essere concordate con il personale del laboratorio al fine di ottimizzare l'esecuzione dei prelievi e dei test diagnostici. I campioni provenienti da casi sospetti, probabili od accertati di infezione influenza aviaria devono arrivare in laboratorio in maniera che siano facilmente identificabili.

Prima di essere posti nel contenitore da trasporto, le provette e gli altri contenitori, identificati da etichette accuratamente compilate con il nome del paziente, la data del prelievo e la tipologia del campione, dovranno essere disinfettati all'esterno con spugnature di soluzione al 3% di ipoclorito di sodio, o di formalina al 4% o altro disinfettante idoneo.

Il campione da avviare all'isolamento virale (prelievo respiratorio) deve essere conservato in ghiaccio fino alla consegna agli operatori che provvederanno alle successive manipolazioni; se ciò non è possibile, il campione deve essere congelato in un ulteriore contenitore a tenuta stagna a -80°C.

Tabella 3 ■ MODALITÀ DI ANALISI DEI CAMPIONI PRESSO L'INMI L. SPALLANZANI

Tipo di campione	Analisi
Siero	Ab per virus pneumotropi in fissazione del complemento Abs anti influenza A inibenti l'Emoagglutinazione Ab anti H5N1 mediante neutralizzazione
Prelievo respiratorio residuo del test rapido	PCR o RT-PCR per: H5N1; Influenza A e B; <i>Metapneumovirus</i> , PIV1-3, RSV, <i>Adenovirus</i> , <i>Rhinovirus</i> , <i>Enterovirus</i> , <i>Coronavirus</i> umani (OC43, 229E, NL63 ed eventualmente SARS-CoV)
Prelievo respiratorio per isolamento virale	Isolamento virale in BSL-3

7. TRATTAMENTO

Al momento attuale, non esistendo trial clinici per la valutazione dell'efficacia del trattamento anti-virale specifico, il trattamento di supporto è fondamentale nella gestione delle complicanze di soggetti affetti da influenza aviaria.

Tuttavia, evidenze scientifiche fondate sulla sperimentazione *in vitro* e sulla sperimentazione con modelli animali, l'esperienza clinica dei casi di infezione aviaria fino ad ora trattati, ed i trial clinici condotti sui ceppi influenzali umani, indicano che 2 classi di farmaci, inibitori delle neuroaminidasi (oseltamivir e zanamivir) e inibitori dei canali M2 (amantadina e rimantadina), possono essere considerati nel trattamento di molti ceppi influenzali A tra cui anche l'H5N1 [48,49].

Pertanto nel maggio 2006 [50] l'OMS ha pubblicato una linea guida operativa, aggiornata nell'agosto 2007 [51] per il trattamento dei pazienti affetti da infezione da H5N1 consultabile al sito: http://www.WHO.int/csr/disease/avian_influenza/guidelinstopic_s/en/index.html (ultimo accesso: 12/09/2008).

In sintesi le linee guida prevedono due differenti situazioni di disponibilità di farmaci:

1. Nel caso in cui sono disponibili inibitori delle neuroaminidasi:
 - a. bisogna iniziare il prima possibile terapia con oseltamivir; in alternativa qualora non sia disponibile l'oseltamivir può essere utilizzato lo zanamivir;
 - b. non bisogna utilizzare amantadina o rimantadina in mono-terapia come prima scelta;
 - c. la terapia di combinazione con un inibitore delle neuroaminidasi ed un inibitore dei canali M2 (ad es. amantadina o rimantadina) può essere considerato qualora i dati della sorveglianza locale indichino che i ceppi virali sono sensibili e qualora sia possibile una raccolta prospettica dei dati nei pazienti trattati.
2. Nel caso in cui non sono disponibili inibitori delle neuroaminidasi possono essere somministrati in prima linea gli inibitori del canale M2, qua-

lora i dati della sorveglianza locale indicano che i ceppi virali sono sensibili.

Considerando nel complesso l'esperienza clinica fino ad ora acquisita, sembra che il trattamento con antivirali non riduca consistentemente la mortalità nei soggetti infetti. Infatti, i dati provenienti da diverse casistiche di pazienti trattati con oseltamivir [52-57], indicano una sopravvivenza del 30% (13 su 34) nei pazienti trattati e del 25% (4 su 16) nei pazienti non trattati [49].

Un'analisi più approfondita di queste stesse casistiche sembra indicare che alla base del successo terapeutico siano almeno tre fattori che possono in parte anche spiegare la scarsa efficacia dei trattamenti fino ad ora impiegati.

In primo luogo, come anche dimostrato dalle curve di sopravvivenza riportate in Figura 5, risulta di grande importanza il tempo di inizio del trattamento. È, infatti, possibile evidenziare che il decesso di molti dei pazienti inclusi nelle precedenti statistiche era dovuto a danni organici irreversibili avvenuti già prima dell'inizio della terapia, e che la letalità nei pazienti che iniziavano il trattamento entro 5 giorni dall'insorgenza dei sintomi era inferiore del 50% rispetto ai pazienti che iniziavano il trattamento più in ritardo [49].

Un secondo elemento importante potrebbe essere la concentrazione raggiunta dal farmaco a livello del sito di infezione. In particolare le attuali dosi raccomandate potrebbero essere, insufficienti ed in parti-

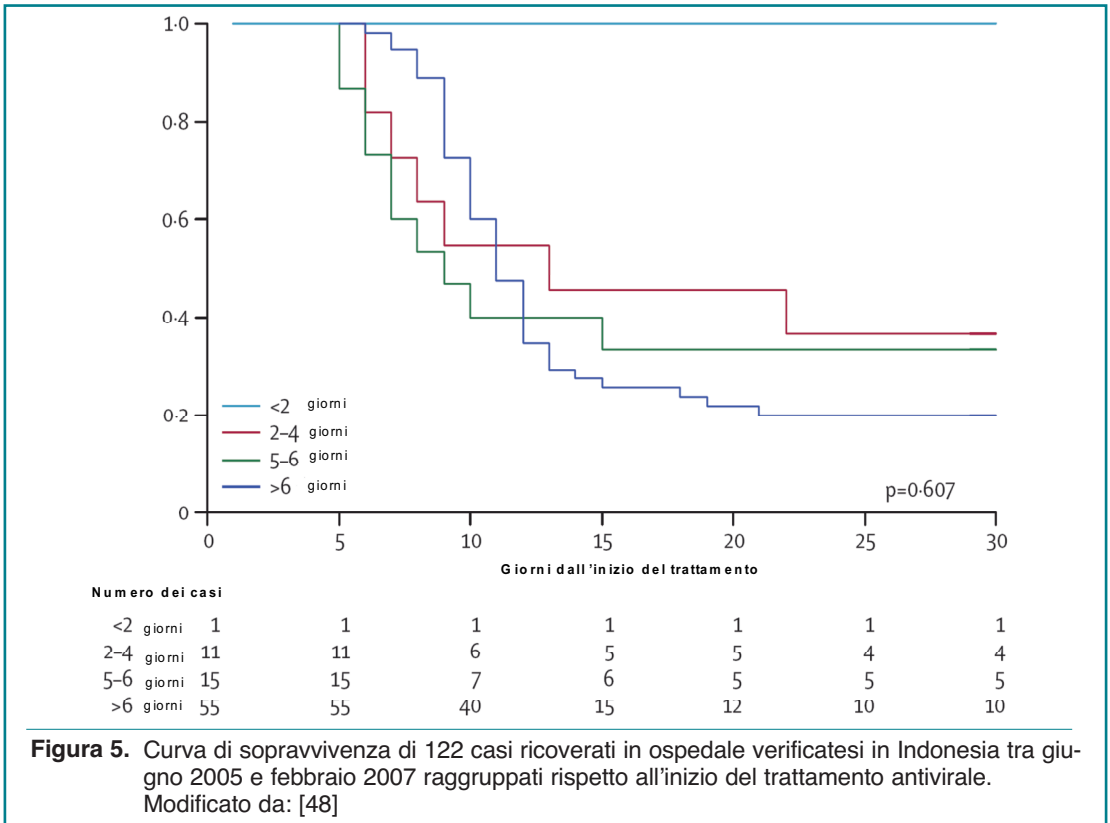


Figura 5. Curva di sopravvivenza di 122 casi ricoverati in ospedale verificatesi in Indonesia tra giugno 2005 e febbraio 2007 raggruppati rispetto all'inizio del trattamento antivirale. Modificato da: [48]

colare potrebbe essere insufficiente l'assorbimento orale nei pazienti con sintomatologia gastroenterica (diarrea, vomito). A conferma di questa osservazione ci sono anche studi che indicano che solo alte concentrazioni di oseltamivir sono in grado di prevenire la morte di animali infettati sperimentalmente con H5N1 [58,59].

Infine un fattore che può spiegare il fallimento del trattamento è la bassa soglia genetica di tutti i farmaci antivirali attualmente in uso. Per quanto riguarda gli inibitori del canale M2 è già nota l'ampia diffusione di resistenza primitiva tra i ceppi di H5N1 isolati in Asia sia nella popolazione animale che nell'uomo. Per quanto invece riguarda gli inibitori delle neuroaminidasi è noto che la resistenza può essere indotta in ceppi suscettibili anche a seguito di un breve periodo di trattamento [48,50].

7.1. Trattamento con inibitori della neuroaminidasi

Sono attualmente disponibili in Italia 2 farmaci per l'uso clinico.

L'oseltamivir [60] resta attualmente il farmaco di prima scelta nelle infezioni da H5N1 ed è attivo in vitro contro tutti i sottotipi N1-N9 di influenza A. il farmaco è attualmente disponibile in compresse da 75mg e sospensione orale da 12mg/ml (*Tamiflu*®). La terapia andrebbe iniziata il prima possibile e benché non esistano chiare evidenze circa la dose ottimale, l'OMS consiglia un corso di terapia standard che consiste in [50]:

- 30mg 2 volte al giorno per 5 giorni in pazienti di peso inferiore ai 15 Kg;
- 45mg 2 volte al giorno per 5 giorni in pazienti di peso tra i 15-23 Kg;
- 60mg 2 volte al giorno per 5 giorni in pazienti di peso tra i 24-40 Kg;
- 75mg 2 volte al giorno per 5 giorni in pazienti di peso oltre i 40 Kg.

Al termine dei 5 giorni la terapia deve essere continuata in caso di persistenza dei

sintomi. Secondo il giudizio clinico, negli adulti e negli adolescenti la dose può essere portata a 150mg 2 volte al giorno per 10 giorni [51].

Benché non esistano dati chiari sulla tossicità del farmaco in corso di gravidanza, le donne gravide andrebbero trattate come gli altri adulti [51].

Non esistono dati sul trattamento dei bambini di età inferiore ad un anno ed in queste circostanze l'utilizzo del farmaco è a discrezione del clinico che deve valutare con cautela i possibili rischi e benefici.

In caso di insufficienza renale è necessario aggiustare il dosaggio se i livelli della *clearance* della creatinina sono inferiori a 30ml/min. Per *clearance* della creatinina tra 10 e 30 il dosaggio consigliato è di 75 mg/die, mentre per pazienti con *clearance* della creatinina inferiori a 10ml/min non esiste un dosaggio consigliato in quanto il farmaco non è dializzabile [50].

L'assorbimento di oseltamivir sembra essere ridotto in pazienti con sintomatologia gastro-intestinale come vomito, stasi gastrica e diarrea, ma al momento attuale non esistono chiare indicazioni circa l'incremento della dose in questi pazienti.

Oseltamivir ha una scarsa interazione con il CY450 e non sono quindi necessarie modificazioni del dosaggio in caso di assunzione in associazione ad altri farmaci metabolizzati da questa via. Studi su animali hanno messo in evidenza che la somministrazione combinata di probenecid è capace di aumentare l'emivita e la concentrazione plasmatica di oseltamivir. Dopo la somministrazione orale, il farmaco si distribuisce uniformemente in tutti i liquidi corporei [60].

Il farmaco non interagisce con i vaccini antiinfluenzali a virus inattivato. È invece controindicata la somministrazione di vaccino a virus vivo attenuato prima di 48 ore dalla sospensione del trattamento antivirale (formulazione vaccinale per altro non disponibile in Italia).

Effetti collaterali fino ad ora riportati [60] sono vomito, diarrea e dolore addominale in circa l'1% dei pazienti trattati per influenza stagionale; raramente sono state osservate reazioni cutanee, *rash*, eczema ed orticaria. Una casistica giapponese riporta disturbi neurologici, tra cui delirio, allucinazioni, convulsioni e comportamento autolesionista in bambini trattati con oseltamivir. Sintomatologia respiratoria come tosse e bronchite è stata riportata in circa il 2-5% dei soggetti adulti trattati con oseltamivir e polmoniti sono state osservate nell'1% dei casi.

Lo zanamivir [61] è un secondo inibitore delle neuroaminidasi indicato dall'OMS in alternativa all'oseltamivir. La formulazione disponibile in commercio (*Relenza*®) è in confezione provvista di meccanismo per la somministrazione per aerosol: ogni inalazione dispensa 5 mg di principio attivo.

La confezione è strettamente personale ed è sconsigliata la condivisione della stessa confezione.

Sono state segnalate reazioni gravi in pazienti affetti da broncopneumopatia cronica ostruttiva

Il dosaggio consigliato è di 2 inalazioni (10mg) 2 volte al dì per 5 giorni nei soggetti di età superiore ai 7 anni. Non esistono dati sul trattamento di bambini di età inferiori ai 7 anni e di donne gravide. Il farmaco è attivo solo al livello delle vie aeree e non raggiunge livelli plasmatici significativi.

Le resistenze nei confronti degli inibitori delle neuroaminidasi sono complesse: alcune conferiscono al virus resistenza crociata per l'intera classe, altre per un solo componente. Attualmente sono state descritte alcune mutazioni in grado di conferire resistenza nei confronti dell'oseltamivir e dello zanamivir in corso di trattamento di pazienti affetti da influenza H5N1: in particolare, l'emergenza di varianti resistenti con mutazione H274Y a carico della neuroaminidasi durante terapia con oseltamivir può essere associata ad

aumentata letalità. Tuttavia, allo stato attuale i ceppi H5N1 *naïve* e presumibilmente, altri ceppi di origine aviaria non esposti ai farmaci possono essere considerati sensibili agli inibitori della neuroaminidasi [49-51].

7.2. Trattamento con inibitori del canale M2.

Sono attualmente disponibili 2 farmaci appartenenti a questa classe: l'amantadina [62] e la rimantadina [63].

L'OMS indica che questi farmaci devono essere usati solo nel caso non ci sia disponibilità di inibitori della neuroaminidasi [50,51]. Rispetto agli inibitori delle neuroaminidasi hanno una minore barriera biologica (oltre il 30% di resistenza alla fine di un trattamento), diffuse resistenze sia tra ceppi virali che causano influenza stagionale che tra ceppi virali di origine aviaria, inoltre rispondono di un maggior numero di effetti avversi. Gli effetti collaterali riportati sono a carico del sistema nervoso centrale, del sistema cardiovascolare e del sistema gastroenterico.

L'amantadina e la rimantadina sono disponibili in commercio in compresse da 100mg.

Il dosaggio consigliato è di 100 mg 2 volte al dì per 5 giorni nei soggetti tra i 10 ed i 65 anni; si consiglia il dosaggio di 100 mg al dì nell'anziano. Il dosaggio pediatrico per bambini sotto i 10 anni è 5mg/kg in due somministrazioni fino ad un massimo di 150 mg al dì; non esistono dati sul trattamento di bambini di età inferiori ad un anno e di donne gravide.

Per l'amantadina è necessario aggiustare il dosaggio in relazione ai livelli di creatinina:

1. per livelli di *clearance* della creatinina tra 30 e 50 ml/min si consiglia 100mg x2 il primo giorno e 100mg i giorni seguenti;
2. per livelli di *clearance* della creatinina tra 15 e 30 ml/min si consiglia 100mg a giorni alterni;

3. per livelli di *clearance* della creatinina inferiori a 15 ml/min si consigliano 200mg 1 volta a settimana.

Per la rimantadina il dosaggio va portato a 100 mg al dì in caso di cirrosi epatica o in caso di grave insufficienza renale con *clearance* della creatinina inferiore a 10 ml/min.

L'amantadina interagisce con diversi farmaci:

1. anticolinergici: effetto sinergico;
2. antistaminici: aumento degli effetti sul sistema nervoso centrale;
3. cotrimossazolo: descritti episodi di delirio;
4. triamterene associato ad idroclorotiazide: riduce l'eliminazione dell'amantadina;
5. chinino e chinidina: riducono l'eliminazione di amantadina.

La rimantadina ha interazioni con aspirina ed paracetamolo che ne riducono del 10-20% la concentrazione plasmatica, anche se sembra di scarsa valenza clinica.

Questi farmaci non interagiscono in nessun modo con le formulazioni vaccinali anti-influenzali a virus inattivato. È invece controindicata la somministrazione di vaccino a virus vivo attenuato prima di 48h ore dalla sospensione del trattamento antivirale.

Una sola mutazione puntiforme in posizione 31 del 7° segmento di RNA codificante per la proteina M2 conferisce resistenza a tutta la classe degli adamantani. In corso di terapia oltre il 30% dei soggetti trattati elimina a fine trattamento virus con questa mutazione [62,63].

7.3. Altre terapie mediche

Dal momento che un certo numero di autopsie ha rilevato segni di emofagocitosi reattiva a seguito di infezioni letali da H5N1 [46,64] in casi selezionati e dopo il consulto con uno specialista ematologo può essere presa in considerazione il trattamento con IG endovena [51].

Benché buona parte del danno tissutale in corso di influenza aviaria sia dovuta ad un'incontrollata risposta immunologica (tempesta citochimica) l'uso di *immunomodulatori*, come corticosteroidi, è sconsigliato a meno che non ci sia il sospetto di *shock* settico ed insufficienza surrenalica [50]. Similmente non esiste alcuna evidenza scientifica a favore dell'utilizzo di anti-infiammatori non steroidei, le statine e anti-TNF [51].

L'evenienza di una sovrainfezione batterica (polmonite o broncopolmonite secondaria) a seguito dell'infezione virale primaria è possibile ma la frequenza e la gravità dell'infezione è stata differente nel corso delle tre ultime pandemie (le polmoniti secondarie hanno causato la gran parte dei decessi nel corso della pandemia del 1918-19 mentre sembrano non aver avuto una grossa incidenza nel corso delle pandemie del 1957 e del 1968) [65].

Per quanto riguarda specificatamente il virus H5N1 non esistono dati che dimostrino una migliore prognosi per pazienti sottoposti a profilassi antibiotica pertanto il trattamento antibiotico empirico per polmonite comunitaria deve essere iniziato e mantenuto in corso di diagnosi ma si consiglia la sospensione dell'antibiotico terapia una volta confermata l'eziologia virale. Nel caso di infezione da H5N1 ed in presenza di esami batteriologici negativi si sconsiglia la profilassi antibiotica [51].

7.4. Terapia di supporto

La somministrazione di ossigeno è un intervento essenziale nel trattamento di soggetti con infezione da H5N1 di grado medio.

Preferibilmente il paziente dovrebbe essere costantemente monitorato con sistemi di pulsio-ossimetria transcutanea e mantenuto costantemente a livelli di saturazione oltre 90%. L'ossigeno dovrebbe essere somministrato con maschera facciale e non con cannule nasali.

In caso di aggravamento del quadro clinico sono sconsigliate le manovre di ventilazione non invasiva sia in quanto i pazienti con infezione ingravescente da H5N1 sviluppano rapidamente ARDS [64,66], che rende inutile la manovra, sia perché non sono trascurabili i rischi di generazione di aerosol infettivi.

La ventilazione invasiva con intubazione oro-tracheale è la modalità preferita di supporto al paziente con infezione da virus aviario complicata da ARDS. Un risultato accettabile può essere considerato quello di mantenere la saturazione transcutanea oltre l'88% ed una PaO₂ oltre 55mmHg. Il rischio maggiore in corso di ventilazione resta quello di pneumotorace a seguito di baro-trauma che si verifica più frequentemente quando sono richiesti volumi elevati. Le manovre di intubazione devono essere eseguite da personale altamente specializzato e deve essere prestata la massima attenzione nell'applicazione di tutte le misure di sicurezza.

8. SORVEGLIANZA: DEFINIZIONE DI CASO

8.1. Premessa all'utilizzo della seguente definizione di caso

La trattazione che segue farà essenzialmente riferimento all'esperienza sulla diagnosi e sul trattamento dei casi di influenza aviaria nell'uomo da H5N1 *Asian lineage*, al momento il ceppo responsabile del maggior numero di infezioni e di un grave quadro clinico. Le seguenti definizioni di caso, che fanno riferimento alla definizione dell'agosto 2006 dell'OMS, sono comunque ragionevolmente applicabili ai casi di trasmissione di qualsiasi ceppo aviario all'uomo, salvo ulteriori differenti raccomandazioni dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) o di altri organismi internazionali e nazionali.

Ulteriori aggiornamenti sono reperibili ai siti: ECDC: http://www.ecdc.europa.eu/Health_topics/Avian_Influenza/Guidance.

html (ultimo accesso: 12/09/2008) OMS: http://www.WHO.int/csr/disease/avian_influenza/guidelines/en/ (ultimo accesso: 12/09/2008)

8.2. Definizione di caso

La possibilità del clinico di imbattersi in un paziente affetto da influenza aviaria è un'evenienza al momento possibile, ma rara. La possibilità che un individuo contragga un virus aviario è plausibile solo in presenza di un effettivo legame epidemiologico tra l'insorgenza dei sintomi e la presunta infezione. Per tale motivo la definizione di caso di influenza aviaria nell'uomo deve sempre rispondere contemporaneamente a requisiti di ordine clinico ed epidemiologico.

Caso in corso di identificazione

Qualsiasi persona per cui le autorità sanitarie abbiano disposto accertamenti diagnostici per influenza aviaria.

Caso sospetto

Si definisce caso sospetto un soggetto che presenti le seguenti caratteristiche:

1. CLINICA: presenti segni e/o sintomi di sindrome influenzale (*influenza-like-illness* - ILI) ovvero un'affezione respiratoria acuta ad esordio brusco ed improvviso con febbre >38°C, accompagnata da almeno un sintomo tra i seguenti:
 - a. cefalea;
 - b. malessere generalizzato;
 - c. sensazione di febbre (sudorazione, brividi);
 - d. astenia;
 - e. almeno uno dei seguenti sintomi respiratori:
 - tosse;
 - faringodinia;
 - congestione nasale.
2. EPIDEMIOLOGIA:
 - a. abbia soggiornato nei dieci giorni precedenti l'inizio della sintomatologia in un paese con epidemia aviaria in corso ed in questa occa-

sione abbia avuto contatto con animali potenzialmente infetti (allevamenti, mercati, ecc.);

oppure

- b. sia un operatore con esposizione occupazionale da non oltre dieci giorni dall'inizio dei sintomi (personale sanitario a contatto con materiale infetto o operatore dell'industria dei polli).

Caso probabile

Un caso che soddisfi la definizione di caso sospetto ed inoltre:

1. a. sia risultato positivo ad un qualsiasi test di laboratorio per influenza A;

oppure

- b. abbia un infiltrato polmonare alla radiografia del torace e insufficienza respiratoria acuta dimostrata all'emogasanalisi;

Un caso che sia deceduto per una patologia acuta polmonare e sia possibile stabilire un legame epidemiologico chiaro con un caso probabile o confermato di infezione aviaria.

2. sia possibile stabilire un legame epidemiologico chiaro con un caso probabile o confermato di infezione aviaria.

Caso confermato

Un caso che soddisfi la definizione di caso sospetto o probabile e per il quale la diagnosi di infezione da virus di origine aviaria sia stata ottenuta con almeno una delle seguenti prove di laboratorio:

1. isolamento colturale (ed identificazione) del virus specifico;
2. PCR specifica positiva che utilizzi almeno due *primer* differenti;
3. un incremento di almeno 4 volte del titolo anticorpale per virus aviario tra il siero prelevato in fase acuta ed il siero prelevato in corso di convalescenza, con un titolo in fase di convalescenza non inferiore a 1:80;
4. un titolo anticorpale specifico superiore a 1:80 con sistema di microneutralizzazione su un singolo campione

di siero prelevato ad almeno 14 giorni dall'insorgenza dei sintomi e successivamente confermato con un test differente (per i test sierologici ed i rispettivi *cut-off* si veda al cap 6.4.).

9. MISURE DI CONTROLLO

9.1. Allerta delle Autorità Sanitarie e notifica dei casi

La normativa italiana [67] prevede che i casi di influenza con identificazione virale siano inclusi nella prima classe delle malattie infettive e diffuse per "... *le quali si richiede segnalazione immediata o perché soggette al Regolamento sanitario internazionale o perché rivestono particolare interesse...*". Inoltre, in linea con l'*International Health Regulation*, il riscontro di un caso possibile di influenza sostenuta da ceppi differenti da quelli stagionali deve essere soggetto a notifica immediata all'OMS da parte dell'istituzione che ha identificato il caso stesso [68].

9.2. Identificazione dei contatti

L'individuazione dei contatti [50] risulta di grande importanza, in quanto indirizza sia le misure preventive di isolamento che la chemiopprofilassi. Le definizioni qui riportate sono applicabili all'infezione da H5N1 e da qualsiasi altro virus implicato in fase 3 pre-pandemica, come definita dall'OMS. Una specifica definizione dovrà essere sviluppata in caso di passaggio ad ulteriori fasi di pandemia ed in particolare nel caso in cui H5N1 o altro ceppo di origine aviaria mostri di poter essere trasmesso con efficienza da uomo a uomo.

Contatto ad alto rischio

Sono definiti contatti ad alto rischio i familiari o i contatti stretti di un caso sospetto o confermato di H5N1. Per contatto stretto si intende una persona che ha condiviso l'alloggio, o si è trovato a distanza inferiore a 1 metro, o si è preso cura di un caso sospetto o confermato. Ciò trova

ragione tra l'altro nella possibile esposizione alla stessa fonte ambientale.

Gli operatori sanitari che, in assenza di adeguate misure di contenimento e protezione individuale, prestano assistenza a pazienti per i quali è stata documentata una trasmissione interumana devono essere considerati ad alto rischio.

Contatto a rischio intermedio

Sono definiti contatti a rischio intermedio le seguenti categorie di soggetti:

1. i soggetti che, senza idonei DPI hanno avuto contatto stretto con animali malati o morti con infezione da H5N1 o con uccelli direttamente implicati in casi di malattia umana; esempi di esposizione ad alto rischio basati su trasmissione confermata all'uomo includono: esposizione non protetta a prodotti animali infetti, consumo di sangue di anatre infette, preparazione di cibo o altri prodotti di animali infetti, esposizione prolungata a uccelli infetti in uno spazio confinato;
2. persone che hanno manipolato animali noti per essere infetti o hanno decontaminato le aree in cui gli animali hanno vissuto, qualora non abbiano adeguatamente usato i DPI richiesti;
3. operatori sanitari senza idonei DPI che hanno:
 - a. eseguito manovre che generano aerosol (ad es. intubazione, broncoscopia, aerosol-terapia etc.) su un caso sospetto o confermato *che non sia noto per aver dato casi secondari di trasmissione umana;*
 - b. lavorato su materiali prelevati da un caso sospetto o confermato.

La definizione di rischio moderato riferita agli operatori sanitari è basata sull'assenza di casi di trasmissione occupazionale riconosciuta.

Contatto a basso rischio

Sono considerati contatti a basso rischio:

1. operatori sanitari che senza idonei DPI hanno avuto contatto a distanza superiore ad un metro con un caso sospetto o confermato;
2. operatori che hanno avuto qualsiasi tipo di contatto o hanno eseguito qualsiasi manovra su casi sospetti o confermati adottando correttamente le precauzioni;
3. personale che ha partecipato alle operazioni di bonifica e/o di soppressione di capi di pollame a fini sanitari in condizioni in cui gli animali coinvolti sembravano ancora non essere stati colpiti dall'infezione;
4. personale che ha partecipato alle operazioni di bonifica e/o di soppressione di capi di pollame a fini sanitari in caso di focolaio epidemico utilizzando correttamente i DPI.

Fino a quando non siano dimostrati casi di trasmissione interumana efficace, la popolazione generale deve essere considerata esente da rischio.

9.3. Misure di isolamento

Come indicato dall'OMS [69], in tutte le fasi dell'assistenza di un caso sospetto di influenza aviaria gli operatori sanitari coinvolti devono applicare, oltre alle precauzioni standard, anche le misure per *droplet*, indossare una mascherina chirurgica e la protezione per gli occhi (occhiali o visiera). I filtranti facciali FFP2 o superiore devono essere indossati da tutti gli operatori sanitari che partecipano a manovre a rischio di generare aerosol.

Inoltre, benché non esistano chiare indicazioni per la trasmissione aerea interumana, è consigliato che il paziente, una volta ricoverato, sia alloggiato in una stanza a pressione negativa; inoltre, si ritiene opportuno che ogni reparto di degenza abbia copia scritta e facilmente consultabile delle procedure di assistenza.

Nel caso in cui il paziente arrivi spontaneamente presso il servizio Accettazione il

personale accettante deve fornire al paziente una mascherina chirurgica, provvedere ad accompagnare il paziente in stanza di isolamento a pressione negativa o almeno in stanza singola ed avvisare immediatamente il Medico di Guardia.

Il Medico di Accettazione deve prontamente classificare il paziente secondo le definizioni di caso e valutarne la necessità di ricovero.

In caso di ricovero, il paziente deve lasciare la sala di isolamento, dove è stato accettato, solo quando si abbia conferma che il reparto abbia messo in opera tutte le misure necessarie per accettarlo.

Nel caso in cui i pazienti fossero più di uno e non si disponesse di sufficienti stanze singole si utilizzeranno stanze a più letti procedendo per coorte.

Le misure di isolamento devono durare fino alla dimissione del paziente.

Precise definizioni devono guidare il comportamento del Medico di Guardia anche nel caso di richiesta di trasferimento di un caso sospetto da parte di altra struttura (per il trasporto dei pazienti si consulti il capitolo Misure di Isolamento).

Di seguito viene riportato l'algoritmo della procedura interna utilizzata presso l'INMI Lazzaro Spallanzani (Figura 6 v. pag. 122).

9.4. Sorveglianza degli esposti

L'OMS ed i CDC consigliano di eseguire sorveglianza attiva di alcuni gruppi di persone indipendentemente dal livello di rischio del contatto.

La sorveglianza in fase pandemica 3, secondo quanto stabilito dall'OMS per il virus H5N1 ed altri ceppi aviari che hanno dato infezioni nell'uomo, ma per i quali non è mai stata dimostrata un'efficiente trasmissione interumana, dovrebbe includere i seguenti gruppi di persone:

1. persone che hanno partecipato ad opere di bonifica di complessi industriali avicoli a seguito di allarme

causato dalla diffusione di ceppi aviari all'interno degli allevamenti di polli [70];

2. personale sanitario che ha avuto contatti protetti o non protetti con casi sospetti o confermati [69];
3. viaggiatori che al ritorno da un viaggio in area endemica riferiscono di aver avuto contatto con uccelli morti o visibilmente malati [71];
4. tutti i contatti indipendentemente dal grado di rischio [50].

A tutte queste persone dovrebbe essere consigliato il controllo della temperatura 2 volte al dì per 7 – 10 giorni. Nessuna restrizione è consigliata per questi soggetti fintanto che restino asintomatici. In caso di comparsa di febbre questi pazienti devono contattare il medico del Centro di riferimento che valuterà le differenti possibilità di intervento in accordo con quanto già detto nella definizione di caso.

10. PROFILASSI VACCINALE

Secondo quanto già consigliato dall'OMS e da altre organizzazioni internazionali (raccomandazioni peraltro recepite nei piani per le campagne vaccinali nazionali in Italia) a tutti gli operatori sanitari dovrebbe essere offerto, ogni anno, vaccino anti-influenzale con la formulazione più recente. Le attuali formulazioni vaccinali contengono, infatti, anche epitopi dei sottotipi N1 ed è stata dimostrata una favorevole cross reattività anche nei confronti degli agenti aviari del sottotipo N1 (H5N1)[72]. Inoltre la vaccinazione contro i ceppi umani maggiormente circolanti nel corso della stagione epidemica potrebbe prevenire il rischio di ricombinazione a seguito di infezione mista di ceppi umani ed aviari con emergenza di ceppi riassortanti a potenziale pandemico.

Per quanto invece riguarda specificamente il virus H5N1 sono attualmente disponibili 3 vaccini.

Il primo, prodotto dalla Sanofi Pasteur,

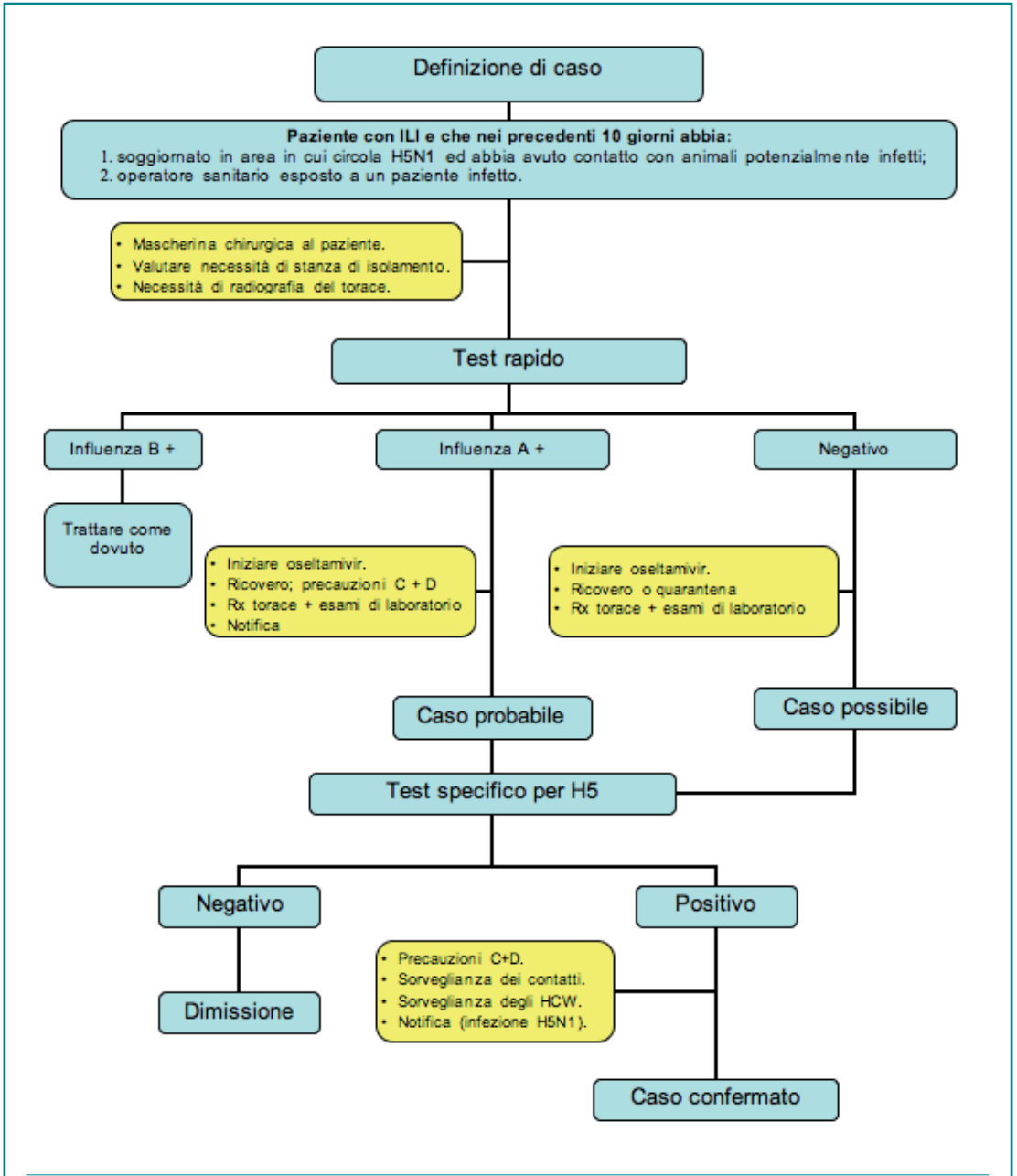


Figura 6. Algoritmo operativo in caso di accettazione di un soggetto con sospetta influenza aviaria in uso presso l'INMI "L. Spallanzani".

è stato licenziato nell'aprile 2007 dall'FDA [73], ed è un vaccino a componenti (*split virus*) inattivato che ha utilizzato il ceppo virale A/Vietnam/1203/2004/H5N1.

Gli altri due vaccini, entrambi prodotti dalla GlaxoSmithKline dal ceppo virale A/Vietnam/1194/2004/H5N1, invece sono stati licenziati dall'EMA e sono quindi disponibili in Europa.

Il primo dei vaccini europei, denominato Daronrix® [74], è stato licenziato il 21 marzo 2007 ed è un vaccino a virus intero inattivato.

Il secondo dei vaccini europei, denominato Pandemrix® [75], è stato licenziato il 20 marzo 2008 è un vaccino a virus a componenti (*split virus*) inattivato ed emulsionato in olio per aumentarne l'immunogenicità.

Oltre ai differenti ceppi virali utilizzati una delle maggiori differenze tra i vaccini europei e quello americano sono le indicazioni.

La FDA, infatti, ha licenziato il vaccino della Sanofi Pasteur come "vaccino per influenza aviaria" vendibile solo alle autorità federali le quali possono renderlo disponibile per la vaccinazione di alcune categorie a rischio come il personale di laboratorio che lavora su ceppi di influenza aviaria.

L'EMA invece ha licenziato i vaccini della GlaxoSmithKline come vaccino per la "profilassi dell'influenza in una situazione di pandemia dichiarata ufficialmente". In pratica il vaccino viene attualmente comprato dalle autorità nazionali in attesa che si verifichi una nuova pandemia (*stock-piling*).

In realtà, le difficoltà che si incontrano nell'ideazione e nella produzione di un vaccino da utilizzare in caso di pandemia sono molteplici ed in primo luogo vanno ricordate l'estrema mutevolezza del virus influenzale ed il fatto che nessuno può prevedere oggi quale mutante virale sarà effettivamente causa della prossima pandemia.

Uno degli approcci utilizzati per affron-

tare questi problemi è quello del *mock-up vaccine* (ovvero vaccino prototipo) su cui si fonda anche l'idea dei vaccini inattivati licenziati in Europa.

Infatti, dal momento che non è prevedibile quale sarà il prossimo ceppo pandemico, le ditte farmaceutiche non sono in grado di preparare in anticipo un vaccino adeguato. Per questo motivo viene prodotto un vaccino che contiene un ceppo di virus influenzale appositamente selezionato perché nessuno vi è stato esposto e nei confronti del quale, pertanto, nessuno è immune. Questo vaccino può essere sperimentato per osservare le reazioni nell'uomo e per avere la possibilità di saggiare quale sia la risposta del sistema immunitario dell'uomo una volta esposto ad antigeni influenzali del tutto nuovi. In caso di pandemia, il ceppo virale presente nei vaccini prototipo verrà sostituito dal ceppo responsabile della pandemia prima che il vaccino venga usato.

Un secondo approccio è, invece, quello della produzione di un vaccino universale anti influenza A ovvero, dal momento che è fortemente probabile che il prossimo ceppo pandemico sarà un ceppo A (i ceppi B e C non hanno potenziale pandemico intrinseco), alcune linee di ricerca hanno iniziato a ricercare epitopi immunodominanti altamente conservati tra tutti i ceppi di influenza A da usare come bersaglio vaccinale.

Al momento attuale i migliori risultati sono stati ottenuti dalla Acambis che ha prodotto un vaccino ricombinante denominato ACAM-FLU-A®.

Questo vaccino è costituito da una proteina ibrida formata dall'antigene HBC del virus dell'epatite B al quale è stato legato come aptene il dominio extracellulare del canale M del virus influenzale A (M2). I primi risultati degli studi pre-clinici e del *trial* di fase I sono stati annunciati a gennaio 2008 (ma attualmente ancora non pubblicati) ed hanno dimostrato una buona tollerabilità nell'uomo e la capacità di pro-

teggere animali infettati sperimentalmente con H5N1 [76].

11. PROFILASSI FARMACOLOGICA

Benché al momento non esistano prove da *trial* clinici, sulla base dell'esperienza dell'uso della profilassi nei confronti dell'influenza umana e di studi condotti su animali, l'OMS consiglia la chemioprofilassi nei contatti a rischio alto e moderato con i seguenti farmaci, da assumere per 7-10 giorni [50]:

1. oseltamivir, alla dose di 75 mg una volta al dì negli adulti e nei bambini con peso >40 Kg; nei bambini superiori ad 1 anno di età la dose consigliata è 30 mg, 45 mg, 60 mg rispettivamente per peso >15 kg, tra 15 e 23 Kg, tra 23 e 40 Kg;
2. zanamivir alla dose di 10 mg una volta al dì nei soggetti sopra i 5 anni di età;
3. inibitori del canale M2 (amantadina e rimantadina): la profilassi con questi farmaci non è consigliata qualora siano disponibili preparazioni con

inibitori delle neuroaminidasi. In assenza di una migliore scelta, ponendo attenzione alla minore tollerabilità di questi farmaci in particolari gruppi di pazienti e soltanto quando non esista documentazione della resistenza del ceppo virale in questione, la profilassi con inibitori M2 può essere intrapresa nei contatti a rischio alto o moderato a queste dosi:

- a. amantadina: 100 mg due volte al dì nei soggetti tra i 10 e i 65 anni di età; 5 mg/kg/die tra 1 e 9 anni di età; 100 mg/die sopra i 65 anni;
- b. rimantadina: 100 mg due volte al dì nei soggetti sopra i 10 anni di età; 5 mg/kg/die (max 150/die) tra 1 e 9 anni di età.

Non esistono indicazioni sulla profilassi dei bambini di età inferiore ad un anno. Dal momento che non esistono chiare indicazioni circa la tossicità di questi farmaci in donne in gravidanza, l'uso di questi farmaci in donne gravide esposte resta al giudizio del clinico che deve valutare il rapporto rischi beneficio dell'intervento.

Bibliografia

1. Cheung TK, Poon LL. Biology of influenza A virus *Ann N Y Acad Sci* 2007;1102:1-25.
2. Palese P, Young JF. Variation of influenza A, B, and C viruses. *Science* 1982;215:1468-74.
3. OMS Influenza N°211 2003/3. Disponibile su: <http://www.OMS.int/mediacentre/factsheets/fs211/en/>.
4. Lupiani B, Reddy SM. The history of avian influenza. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis Jun* 2008.
5. Shoham D. Review: molecular evolution and the feasibility of an avian influenza virus becoming a pandemic strain--a conceptual shift. *Virus Genes* 2006;33:127-32.
6. OMS Epidemic and Pandemic Alert and Response (EPR). Disponibile su: http://www.OMS.int/csr/disease/avian_influenza/phase/en/.
7. Kamps BS, Hoffmann C, Preiser W. Influenza Report 2006 Flying Publisher 2006 cap.3: 87-91. Disponibile su: <http://www.InfluenzaReport.com>.
8. Wagner R, Matrosovich M, Klenk HD. Functional balance between haemagglutinin and neuraminidase in influenza virus infections. *Rev Med Virol* 2002;12:159-66.
9. Lakadamyali M, Rust M, Babcock H, et al. "Visualizing infection of individual influenza viruses". *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:9280-5.
10. Cros J, Palese P. Trafficking of viral genomic RNA into and out of the nucleus: influenza, Thogoto and Borna disease viruses *Virus Res* 2003;95:3-12.
11. Kash J, Goodman A, Korth M, et al Hijacking of the host-cell response and translational control during influenza virus infection". *Virus Res* 2006;119:111-20.
12. Nayak D, Hui E, Barman S. Assembly and budding of influenza virus. *Virus Res* 2004;106:147-65.
13. Hampson AW, Mackenzie JS. The influenza viruses. *Med J Aust* 2006;185:S39-43.
14. Drake J. Rates of spontaneous mutation among RNA viruses *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90:4171-5.
15. Webster RG, Bean WJ, Gorman OT, et al. Evolution and ecology of influenza A viruses *Microbiol Rev* 1992; 56:152-79.
16. Horimoto T, Nakayama K, Smeekens SP, et al Proprotein-processing endoproteases PC6 and furin both activate hemagglutinin of virulent avian influenza viruses." *J Virol* 1994; 68:6074-8.
17. Taubenberger JK, Reid AH, Lourens RM, et al Characterization of the 1918 influenza virus polymerase genes. *Nature* 2005;437:889-93.
18. Fouchier RA, Schneeberger PM, Rozendaal FW, et al. Avian influenza A virus (H7N7) associated with human conjunctivitis and a fatal case of acute respiratory distress syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101:1356-61.
19. Amonsin A, Payungporn S, Theamboonlers A. Genetic characterization of H5N1 influenza A viruses isolated from zoo tigers in Thailand. *Virology* 2006;344:480-91.
20. Seo SH, Hoffmann E, Webster RG. Lethal H5N1 influenza viruses escape host anti-viral cytokine responses. *Nat Med* 2002;8:950-4.
21. Lipatov AS, Andreansky S, Webby RJ, et al. Pathogenesis of Hong Kong H5N1 influenza virus NS gene reassortants in mice: the role of cytokines and B- and T-cell responses. *J Gen Virol* 2005;86:1121-30.
22. Tellier. Review of aerosol transmission of influenza A virus *Emerg Infect Dis* 2006;12:1657-62.
23. Belser JA, Blixt O, Chen LM, et al. Contemporary North American influenza H7 viruses possess human receptor specificity: Implications for virus transmissibility. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:7558-63.

24. Peiris JS, de Jong MD, Guan Y. Avian influenza virus (H5N1): a threat to human health. *Clin Microbiol Rev* 2007;20:243-67.
25. Shinya K, Ebina M, Yamada S, et al. Avian flu: Influenza virus receptors in the human airway. *Nature* 2006; 440:435-36.
26. Olsen SJ, Ungchusak K, Sovann L, et al. Family clustering of avian influenza A (H5N1). *Emerg Infect Dis* 2005;11:1799-1801.
27. Taubenberger JK, Morens DM. 1918 influenza: the mother of all pandemics. *Emerg Infect Dis* 2006; 12:15-22.
28. Van Reeth K. Avian and swine influenza viruses: our current understanding of the zoonotic risk. *Vet Res* 2007; 38:243-60.
29. Koopmans M, Wilbrink B, Conyn M, et al. Transmission of H7N7 avian influenza A virus to human beings during a large outbreak in commercial poultry farms in the Netherlands. *Lancet* 2004;363:587-93.
30. Du Ry van Beest Holle M, Meijer A, Koopmans M, et al. Human-to-human transmission of avian influenza A/H7N7, The Netherlands, 2003. *Euro Surveill* 2005;10:264-8.
31. CDC. Past Avian Influenza Outbreaks. Disponibile su: <http://www.cdc.gov/flu/avian/outbreaks/past.htm>
32. Hirst M, Astell CR, Griffith M, et al. Novel avian influenza H7N3 strain outbreak, British Columbia. *Emerg Infect Dis* 2004;10:2192-5.
33. Nguyen-Van-Tam JS, Nair P, Acheson P, et al. Outbreak of low pathogenicity H7N3 avian influenza in UK, including associated case of human conjunctivitis. *Euro Surveill.* 2006;11.
34. Eurosurveillance editorial office Avian influenza A/(H7N2) outbreak in the United Kingdom. *Euro Surveill.* 2007;12.
35. CIDRAP News. "Hong Kong probes human case of avian flu" Dec 10, 2003. Disponibile su: <http://www.cidrap.umn.edu/cidrap/content/influenza/avianflu/news/dec1003avianflu.html>.
36. CIDRAP News. "Child's H9N2 flu case probably from birds" Mar 28, 2007. Disponibile su: <http://www.cidrap.umn.edu/cidrap/content/influenza/avianflu/news/mar2807h9n2.html>.
37. OMS Regional Office Pan American Health Organization - EID Weekly Updates. "Avian Influenza Virus A (H10N7) Circulating among Humans in Egypt". Disponibile su: <http://www.paho.org/English/AD/DPC/CD/eid-eer-07-may-2004.htm>.
38. Puzelli S, Di Trani L, Fabiani C, et al. Serological analysis of serum samples from humans exposed to avian H7 influenza viruses in Italy between 1999 and 2003. *J Infect Dis* 2005;192:1318-22.
39. Gill JS, Webby R, Gilchrist MJR, et al. Avian influenza among waterfowl hunters and wildlife professionals. *Emerg Infect Dis* 2006 Aug;12:1284-6.
40. Ungchusak K, Auewarakul P, Dowell SF, et al. Probable person-to-person transmission of avian influenza A (H5N1). *N Engl J Med* 2005;52:333-40.
41. Wang H, Feng Z, Shu Y, et al. Probable limited person-to-person transmission of highly pathogenic avian influenza A (H5N1) virus in China. *Lancet* 2008; 371:1427-34.
42. Dinh PN, Long HT, Tien NT, et al. Risk factors for human infection with avian influenza A H5N1, Vietnam, 2004. *Emerg Infect Dis* 2006;12:1841-7.
43. Liem NT, Lim W. Lack of H5N1 avian influenza transmission to hospital employees, Hanoi, 2004. *Emerg Infect Dis* 2005;11:210-5.
44. Wong SS, Yuen KY. Avian influenza virus infections in humans. *Chest* 2006;29:156-68.
45. Yu H, Gao Z, Feng Z, et al. Clinical characteristics of 26 human cases of highly pathogenic avian influenza A (H5N1) virus infection in China. *PLoS ONE* 2008;3:e-2985.
46. To KF, Chan PKS, Chan KF, et al. Pathology of fatal human infection associated with avian influenza A H5N1 virus. *J Med Virol* 2001;63:242-6.
47. Abdel-Ghafar AN, Chotpitayasunondh T, Gao Z, et al. Update on avian influenza A (H5N1) virus infection in humans. *N Engl J Med.* 2008;358:261-73.
48. Kandun IN, Tresnaningsih E, Purba WH, Lee V et al. Factors associated with case fatality of

- human H5N1 virus infections in Indonesia: a case series. *Lancet* 2008;372:744-9.
49. Gambotto A, Barratt-Boyes SM, de Jong MD et al. Human infection with highly pathogenic H5N1 influenza virus. *Lancet* 2008;371:1464-75.
 50. OMS - OMS Rapid Advice Guidelines on pharmacological management of humans infected with avian influenza A (H5N1) virus - May 2006. Disponibile su: http://www.OMS.int/csr/disease/avian_influenza/guidelines/pharmamangement/en/index.html.
 51. OMS -Clinical management of human infection with avian influenza A (H5N1) virus -August 2007.
 52. Chotpitayasunondh T, Ungchusak K, Hanshaoworakul W, et al. Human disease from influenza A (H5N1), Thailand, 2004. *Emerg Infect Dis* 2005;11:201-9.
 53. Tran TH, Nguyen TL, Nguyen TD, et al. Avian influenza A (H5N1) in 10 patients in Vietnam. *N Engl J Med* 2004;350:1179-88.
 54. de Jong MD, Bach VC, Phan TQ, et al. Fatal avian influenza A (H5N1) in a child presenting with diarrhea followed by coma. *N Engl J Med* 2005;352:686-91.
 55. de Jong MD, Tran TT, Truong HK, et al. Oseltamivir resistance during treatment of influenza A (H5N1) infection. *N Engl J Med* 2005;353:2667-72.
 56. Kandun IN, Wibisono H, Sedyaningsih ER, et al. Three Indonesian clusters of H5N1 virus infection in 2005. *N Engl J Med* 2006;355:2186-94.
 57. Oner AF, Bay A, Arslan S, et al. Avian influenza A (H5N1) infection in eastern Turkey in 2006. *N Engl J Med* 2006;355:2179-85.
 58. Govorkova EA, Ilyushina NA, Boltz DA, et al. Efficacy of oseltamivir therapy in ferrets inoculated with different clades of H5N1 influenza virus. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51:1414-24.
 59. Yen HL, Monto AS, Webster RG, et al. Virulence may determine the necessary duration and dosage of oseltamivir treatment for highly pathogenic A/Vietnam/1203/04 influenza virus in mice. *J Infect Dis* 2005; 192:665-72.
 60. Medscape Drug Reference "Oseltamivir Phosphate Oral". Disponibile su: <http://www.medscape.com/druginfo/dosage?drugid=17762&drugname=Oseltamivir+Phosphate+Oral&monotype=default>.
 61. Medscape Drug Reference "Zanamivir Inhl". Disponibile su: <http://www.medscape.com/druginfo/dosage?drugid=17453&drugname=Zanamivir+Inhl&monotype=default>.
 62. Medscape Drug Reference "Amantadine Oral". Disponibile su: <http://www.medscape.com/druginfo/dosage?drugid=750&drugname=Amantadine+Oral&monotype=default>.
 63. Medscape Drug Reference "Rimantadine Oral". Disponibile su: <http://www.medscape.com/druginfo/dosage?drugid=11597&drugname=Rimantadine+Oral&monotype=default>.
 64. Peiris J et al. Re-emergence of fatal human influenza A subtype H5N1 disease. *Lancet* 2004; 363:617-9.
 65. Morens DM, Taubenberger JK, Fauci AS. Predominant Role of Bacterial Pneumonia as a Cause of Death in Pandemic Influenza: Implications for Pandemic Influenza Preparedness. *J Infect Dis* 2008; 198:962-70.
 66. Shu Y, Yu H, Li D. Lethal avian influenza A (H5N1) infection in a pregnant woman in Anhui Province, China. *N Engl J Med* 2006;354:1421-2.
 67. Gazz. Uff. 8 gennaio 1991, n. 6 e successive modifiche Gazz. Uff. 9 settembre 1998.
 68. OMS - Case definitions for the four diseases requiring notification to OMS in all circumstances under the IHR (2005). Disponibile su: http://www.OMS.int/csr/ihr/case_definitions/en/index.html.
 69. OMS - Avian Influenza, Including Influenza A (H5N1), in Humans: OMS Interim Infection Control Guideline for Health Care Facilities Date of most recent amendment: 10 May 2007. Disponibile su: http://www.OMS.int/csr/resources/publications/AI_Inf_Control_Guide_10May2007.pdf.
 70. CDC "Interim Guidance for Protection of Persons Involved in U.S. Avian Influenza Outbreak Disease Control and Eradication

- Activities". Last modified January 14, 2006. Disponibile su: <http://www.cdc.gov/flu/avian/professional/protect-guid.htm>.
71. CDC "Outbreak Notice Guidelines and Recommendations Avian Influenza A (H5N1) Virus Update: Information for U.S. Citizens Living Abroad". February 2, 2007. Disponibile su: http://www.cdc.gov/travel/other/avian_flu_ig_americans_abroad_032405.htm.
 72. Gioia C, Castilletti C, Tempestilli M, et al. Cross-subtype immunity against avian influenza in persons recently vaccinated for influenza. *Emerg Infect Dis* 2008;14:121-8.
 73. FDA Product Approval Information Influenza Virus Vaccine, H5N1. Disponibile su: <http://www.fda.gov/cber/products/h5n1.htm>.
 74. EMEA - EPARs for authorised medicinal products for human use: Daronrix. Disponibile su: <http://www.emea.europa.eu/humandocs/Humans/EPAR/daronrix/daronrix.htm>.
 75. EMEA - EPARs for authorised medicinal products for human use: Pandemrix. Disponibile su: <http://www.emea.europa.eu/humandocs/Humans/EPAR/pandemrix/pandemrix.htm>.
 76. Acambis reports positive data from trials of universal influenza A vaccine, 3 January 2008. Disponibile su: <http://www.acambis.co.uk/default.asp?id=2039>