

VAIOLO

*Francesco Vairo
Silvia Pittalis
Concetta Castilletti
Antonino Di Caro
Maria Rosaria Capobianchi
Eleonora Lalle
Giuseppe Ippolito
Vincenzo Puro*

1. INTRODUZIONE

Il vaiolo è un'infezione acuta contagiosa causata dal virus *variola*. Si tratta di una delle malattie più devastanti che hanno colpito l'umanità, provocando ripetute epidemie che hanno cambiato il corso della storia. *Variola virus* è tradizionalmente classificato come *Variola major* che provoca una malattia grave con letalità del 20-50%, e *Variola minor* che comprende tra gli altri il ceppo Alastrim, causa di una forma più lieve con letalità inferiore all'1% [1]. Il virus non esiste più in natura allo stato indigeno: l'ultimo caso fu riportato in Somalia nel 1977; successivamente non sono stati segnalati casi naturali nonostante l'intensiva sorveglianza [2]. L'ultimo caso umano si è verificato nel 1978 in Inghilterra in seguito ad un incidente di laboratorio. L'uomo è considerato l'unico *réservoir* naturale [3]. Nel 1980 l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) dichiarò ufficialmente l'eradicazione del vaiolo [1].

Variola virus è conservato in due laboratori approvati dall'OMS, presso i *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) di Atlanta, Stati Uniti, e il *Russian Centre for Research on Virology and Biotechnology* di Koltsovo, Federazione Russa [4]. Dubbia l'esistenza di riserve non note di *Variola virus* [4].

Per la sua alta infettività e stabilità il virus è considerato un ottimo candidato come arma biologica. La comparsa anche di un solo caso deve essere considerata un'emergenza sanitaria.

Non esiste, ad oggi, una terapia specifica e l'unica misura farmacologica efficace è la vaccinazione pre-esposizione.

2. VIROLOGIA E PATOGENESI

Variola virus è un virus a DNA appartenente al genere *Orthopoxvirus* della famiglia *Poxviridae*. Gli *Orthopoxvirus* sono tra i virus più grandi e complessi che si cono-

scano. *Variola virus* presenta un diametro di 200 nm; il genoma è costituito da DNA singolo, a doppio filamento, con 200.000 paia di basi, in grado di codificare circa 200 proteine differenti.

Sulla base della gravità della malattia, *variola virus* viene classificato in *major* e *minor*. Di quest'ultimo si conoscono tre differenti ceppi: Alastrim (il più comune), Amass e Kaffir. Tre altri membri dello stesso genere (*Monkeypox*, *Vaccinia* e *Cowpox*) possono infettare naturalmente l'uomo [3].

La sopravvivenza del virus nell'ambiente è inversamente proporzionale alla temperatura ed all'umidità: prima dell'eradicazione, la più alta incidenza si verificava nella stagione invernale e primaverile in zone dove queste stagioni presentano bassa temperatura e umidità [4].

Data l'assenza di casi di malattia dal 1977, quanto si conosce della patogenesi del vaiolo deriva da studi effettuati su altri membri del genere *Orthopoxvirus* e dalle osservazioni cliniche e di laboratorio delle infezioni sistemiche da essi provocate.

Tipicamente, la porta di entrata principale dell'infezione naturale è la mucosa orofaringea o respiratoria; cute e, raramente, congiuntiva e placenta sono vie alternative [3]. Nel sito di entrata il virus infetta i macrofagi, all'interno dei quali viene trasportato attraverso il sistema linfatico ai linfonodi regionali; si moltiplica ed entra nel torrente ematico causando una viremia primaria asintomatica (3°-4° giorno dopo l'infezione), con disseminazione a milza, midollo osseo, altri linfonodi. La comparsa dei sintomi prodromici con febbre e segni di tossiemia inizia intorno al 10°-14° giorno (*range* 7°-17°) dall'infezione, in concomitanza con la viremia secondaria che stimola la risposta immunitaria: i macrofagi attivati e i linfociti producono citochine infiammatorie e interferoni che stimolano le cellule NK; sono inoltre prodotti anticorpi neutralizzanti diretti contro antigeni della membrana

esterna. Il virus si localizza quindi a livello dei piccoli vasi del derma e della mucosa orofaringea, con comparsa (14° giorno) dell'esantema e dell'enantema caratteristici della malattia. In questa fase, inoltre, milza, linfonodi, reni, fegato e midollo osseo contengono un'enorme quantità di virioni [6].

Gli eventi patogenetici che sottendono l'evoluzione delle lesioni cutanee iniziano con la dilatazione dei capillari del derma, il rigonfiamento delle cellule endoteliali e l'infiammazione perivascolare; segue l'interessamento dell'epidermide, le cui cellule - che presentano nel citoplasma i caratteristici corpi di Guarnieri - vacuolizzano e crescono in dimensioni fino alla rottura, dando origine alle vescicole; queste si trasformano in pustole per la migrazione in esse dei polimorfonucleati; segue quindi il graduale riassorbimento con formazione di croste o piaghe [3]. La guarigione delle lesioni comporta la riepitelizzazione e la formazione di cicatrici.

La morte è dovuta generalmente all'intensa tossiemia, probabilmente associata alla presenza di immunocomplessi circolanti [4].

3. EPIDEMIOLOGIA

L'origine del vaiolo si fa risalire in Asia a più di 3.000 anni fa: di qui si diffuse in Europa e Nord-Africa [3]. Mummie egiziane del 1500 a.C. mostrano lesioni cutanee suggestive di vaiolo [4]. La colonizzazione europea introdusse l'infezione in America nel XVI secolo. Al momento dell'introduzione della vaccinazione (fine XVIII secolo) il vaiolo era endemico in tutto il mondo, tranne in aree remote e scarsamente popolate di Australia, Nuova Zelanda, isole del Pacifico, dell'Atlantico e dell'Oceano Indiano [3]. La vaccinazione, prima con *Cowpox virus*, quindi con *Vaccinia virus*, portò all'eradicazione della malattia in Europa, Unione Sovietica,

Nord-America ed America Centrale già nei primi anni '50 [3]. Molti degli *outbreak* che si verificarono in Europa e Nord-America dopo la Seconda Guerra Mondiale furono di piccole dimensioni [7], ma la malattia rimase endemica in molti Paesi in Via di Sviluppo con circa 50 milioni di casi ogni anno [1]. La successiva campagna globale dell'OMS attraverso la vaccinazione di massa e la stretta sorveglianza degli *outbreak* portarono alla completa eradicazione del virus nel 1980.

Le ragioni di un così importante successo sono anche nelle caratteristiche epidemiologiche del virus [3]:

- l'uomo è l'unico *réservoir* naturale;
- non esiste trasmissione attraverso vettori;
- il virus non è capace di sopravvivere nell'ambiente per lungo tempo;
- la malattia presenta delle caratteristiche cliniche facilmente identificabili;
- l'infettività è relativamente bassa, richiedendo contatti stretti faccia a faccia, eccetto che in particolari circostanze; generalmente solo le persone con il caratteristico *rash* trasmettono il virus;
- non esiste uno stato di portatore cronico;
- è disponibile un vaccino efficace;
- il periodo di incubazione è abbastanza lungo da permettere di instaurare strategie di contenimento.

La trasmissione interumana del virus avviene principalmente attraverso *droplet*, e richiede un contatto stretto, faccia a faccia, come può avvenire tra familiari [3].

La trasmissione aerea è stata documentata in due episodi nosocomiali in Germania nel 1961 e nel 1970 [5]. I pazienti indice trasmisero il virus rispettivamente a 19 persone (di cui 10 non avevano avuto contatto diretto con il paziente) e a 17 persone (nessuna di queste aveva avuto un contatto diretto con il paziente indice):

l'umidità e la scarsa efficienza dei sistemi di aerazione possono aver facilitato la disseminazione del virus [4].

Dati mettono in evidenza la possibilità di trasmissione attraverso fomit, indumenti o biancheria [9]. È stato riportato un caso di infezione oculare e 5 casi per puntura con ago in laboratoristi che lavoravano con ceppi di virus vaccinico. Infine, sono documentati casi di trasmissione attraverso contatto diretto con lesioni cutanee e liquidi corporei [9].

La dose infettante è presumibilmente bassa (da 10 a 100 organismi) e l'infettività, diversamente dalla varicella, sembra inizi con la comparsa dell'esantema. Comunque, vista la presenza di lesioni orali ulcerate già nei primi due giorni di febbre precedenti il *rash*, il paziente è da ritenersi contagioso dalla comparsa della febbre [10]. L'infettività è massima nella prima settimana dopo la comparsa del *rash*, quando le lesioni orali vanno incontro ad ulcerazione rilasciando un'enorme quantità di virus nella saliva; la più alta frequenza stimata di trasmissione secondaria si ha da 3 a 6 giorni dopo la comparsa della febbre [4]. Il tasso di attacco secondario osservato nell'era pre-eradication era del 58,4% [37-88%] nei non vaccinati e del 3,8% nei vaccinati [3]: variabilità dovuta, principalmente, alla quantità di virus escreto nelle secrezioni orofaringee e al numero ed alla durata di contatti stretti faccia a faccia [9]. La media dei casi che un soggetto può infettare (tasso di riproduzione) è di 3,5-6 casi [11], da quanto osservato in *outbreak* in popolazioni con bassa memoria immunitaria specifica, portando ad un rapido incremento dei casi prima che possano essere messe in atto misure di controllo adeguate [4]. Il periodo di infettività dura fino alla caduta delle croste: particelle virali possono esservi presenti, ma racchiuse in coaguli di fibrina, il che rende le croste relativamente non contagiose [4].

4. VAIOLO E BIOTERRORISMO

L'alta morbidity e letalità, l'assenza di un trattamento specifico, l'assenza di una vaccinazione disponibile su scala mondiale, la stabilità ambientale e la facilità con cui può essere prodotto su larga scala, l'alta infettività in un contesto in cui non più del 25% della popolazione mondiale conserva una immunità relativamente adeguata, fanno del vaiolo un ottimo candidato come arma biologica. Il virus è pertanto incluso nella lista A (*high priority*) dei CDC [12].

Il vaiolo fu impiegato a tale scopo nella guerra franco-indiana del 1754-1767 negli Stati Uniti, quando le truppe inglesi disseminarono la malattia nella popolazione indiana attraverso coperte usate da soggetti infetti.

Diversi Paesi hanno condotto esperimenti sul virus finché, nel 1972, più di 140 Paesi firmarono la *Biological and Toxic Weapons Convention*, impegnandosi ad interrompere qualsiasi ricerca su armi biologiche e a distruggere le scorte esistenti del virus. I due laboratori di Atlanta e di Koltsovo sono gli unici autorizzati dall'OMS a conservare il virus, ma a dispetto delle diverse ammonizioni dell'OMS, esiste il reale pericolo che il virus possa essere presente in altri laboratori. L'ex Unione Sovietica avrebbe inoltre continuato il programma di ricerca sull'uso di armi biologiche negli anni '80 e '90 e non si esclude che l'episodio di vaiolo del 1971 in Kazakhstan coinvolgente 10 persone derivasse da un esercizio bellico [4].

L'OMS ha disposto nel 2001 che le scorte esistenti del virus siano ulteriormente e temporaneamente conservate all'interno di specifici e autorizzati progetti di ricerca: la data prevista di distruzione è stata quindi rimandata ed è sottoposta annualmente a revisione da parte della *World Health Assembly*, rimanendo la necessità di eliminare completamente il virus l'obiettivo irrevocabile [13].

Considerando che la maggior parte della popolazione mondiale è suscettibile all'infezione e la reale possibilità che virus simili possano essere prodotti in laboratorio, il livello di sorveglianza deve essere tenuto alto.

La modalità più efficiente per un eventuale rilascio intenzionale è considerata quella via aerosol (ad esempio in un aeroporto o in metropolitana); altre possibilità includono l'uso di "uomini-vettori" o di fomiti (ad esempio lettere) [4]. Un recente modello stocastico ha stimato che 100 casi di malattia in una città di 2 milioni di abitanti risulterebbero in soli 730 casi secondari se le misure di controllo fossero adottate 25 giorni dopo il rilascio deliberato, mentre si registrerebbe un incremento dei casi di circa quattro volte se si intervenisse 40 giorni dopo [14].

5. MANIFESTAZIONI CLINICHE

Il vaiolo si manifestava in due forme principali - *variola major* e *minor* - dalle caratteristiche simili, con un decorso più lieve e una minore letalità nella forma *minor* [1].

La forma ordinaria del vaiolo *major*, osservata in quasi il 90% dei casi di infezione, si presentava con lesioni cutanee pustolose rilevate [3]. La forma emorragica e la forma maligna costituivano due forme rare della malattia, invariabilmente fatale la prima - in cui il *rash* era accompagnato da emorragie mucose e cutanee - quasi sempre fatale la maligna, caratterizzata da lesioni cutanee che non passavano alla forma pustolosa ma rimanevano piatte, usualmente confluenti [1,3]. Il vaiolo *modificato* era un'ulteriore manifestazione della forma *major*, osservato maggiormente in persone con una residua immunità da precedente vaccinazione [3,4]. Il vaiolo *sine eruptione* era similmente osservato in contatti vaccinati e risolveva in 1-2 giorni [3,4].

Nella **forma ordinaria** [1,3,4,15], il periodo di incubazione era di 12-14 giorni (*range* 7-17).

Compariva improvvisamente una sindrome similinfluenzale, con febbre (spesso >40°C), malessere generale, vomito, cefalea, dorsalgie e, raramente, delirio, dolori addominali e diarrea in diverse percentuali di frequenza (Tabella 1). Il paziente rimaneva sofferente, spesso in stato tossiemico, per 2-3 giorni, dopo i quali la febbre scendeva, seguiva un breve miglioramento e compariva l'esantema maculare. L'esantema poteva essere preceduto di 24 ore dalla comparsa di lesioni maculari sulla mucosa orofaringea che si ulceravano rilasciando un elevato numero di virioni nella saliva.

Il *rash* iniziava al volto e diffondeva in senso centrifugo al tronco, alle estremità prossimali e quindi distali: le lesioni erano prevalenti a livello del volto e delle estremità distali (compreso il palmo delle mani e la pianta dei piedi dove persisteva più a lungo). Dopo 1-2 giorni le lesioni maculopapulari evolvevano in vescicole e nel giro di 3-5 giorni in pustole. Le vescicole avevano un'ombelicazione centrale che poteva persistere nella fase pustolosa, quindi si appiattivano. Le pustole erano caratteristicamente rotonde, tese e ancorate profondamente al derma. Le lesioni erano spesso dolenti, confluenti, semiconfluenti o in numero esiguo - il che rivestiva un significato prognostico - ed avevano inizio e progressione relativamente sincroni. Dopo 8-9 giorni dalla comparsa del *rash* le pustole gradualmente lasciavano il posto a croste, più evidenti al volto, che verso la fine della seconda settimana iniziavano a cadere con possibile persistenza di cicatrici.

Il quadro poteva essere complicato [3,4,16] da squilibri elettrolitici, dovuti all'accumulo sottocutaneo massivo di fluidi nella fase vescicolare e pustolosa fino all'insufficienza renale; la desquamazione cutanea massiva, come da grave ustione, poteva presentarsi nel caso di un quadro confluyente; infezioni batteriche secondarie erano rare, mentre le polmoniti virali erano relativamente comuni. Altre rare complica-

zioni erano costituite da ulcerazioni corneali e cheratiti, osteomieliti, orchite; le encefaliti erano indistinguibili dalle demielinizzazioni perivascolari successive a morbillo e varicella [14,15].

La morte, che solitamente avveniva durante la seconda settimana di malattia, era il risultato di una massiva tossiemia, associata alla presenza di immunocomplessi circolanti e di antigeni virali. La letalità era del 30% (15-45%) [1].

La **forma maligna** [1,15], osservata nel 6% dei casi in epoca precedente l'eradica-

zione, soprattutto in bambini, si differenziava dall'ordinaria per la maggior frequenza di un *pattern* confluyente delle lesioni, più comunemente piatte, raramente evolventi a pustole, vellutate e calde al tatto a 4-5 giorni dalla comparsa. Se il paziente sopravviveva, la graduale scomparsa delle lesioni non era seguita da cicatrici. La letalità era del 97%.

Il **vaiolo emorragico** [3,4] presentava una fase prodromica simile all'ordinaria, ma di intensità maggiore: grave lo stato di prostrazione e la febbre molto elevata.

Tabella 1 ■ VARIOLA MAJOR E MINOR: FREQUENZA PERCENTUALE DEI SINTOMI

| Sintomi | Variola major | Variola minor | |
|--------------------|---------------------------|--------------------------------|----------------------------------|
| | 6.942 casi (Rao, 1972) | 12.847 casi (Marsden, 1936) | 859 casi (Noble et al., 1970) |
| Febbre | 100 | ... | 98,2 |
| Cefalea | 90 | 75,0 | 79,4 |
| Malessere | ... | ... | 66,7 |
| Brividi | 60 | 34,0 | 62,4 |
| Anoressia | ... | ... | 60,6 |
| Dorsalgia | 90 | 38,8 | 44,2 |
| Faringite | 15 | 20,6 | 38,2 |
| Nausea | ... | 11,0 | 37,0 |
| Vomito | 50 | 34,2 | 30,3 |
| Diarrea | 10 | ... | 3,6 |
| Delirio | 15 | ... | ... |
| Coliche addominali | 13 | ... | ... |
| Convulsioni | 7 | ... | ... |

Fonte: [3]

L'esantema compariva precocemente (massimo in 2 giorni): si trattava di un eritema scuro, seguito dalla comparsa di petecchie e ecchimosi su cute e mucose. Possibili le emorragie mucose, interessanti diversi organi: emorragie sottocongiuntivali, ematuria, epistassi, ematemesi e melena, emottisi. Presenti i segni di una coagulazione intravascolare disseminata. Le donne in stato di gravidanza e i soggetti immunocompromessi sembravano più suscettibili a questa forma di malattia [17,18]. Questa forma era responsabile del 2-3% dei casi di malattia, con letalità del 96% [15].

La **forma modificata** [3,4] era simile clinicamente alla forma ordinaria, ma con un decorso accelerato, manifestazioni più lievi, minor numero di lesioni cutanee e minore letalità. Tale forma, nella maggior parte dei casi, colpiva soggetti vaccinati ed aveva una letalità molto bassa.

Il **vaiolo sine eruptione** colpiva ugualmente individui vaccinati ed era caratterizzato da sintomi prodromici più lievi senza comparsa del *rash* [1].

Nei bambini la malattia si presentava in forma simile a quanto osservato negli adulti, con una letalità generalmente più alta

(>40%) [4]. Nelle donne in gravidanza la malattia poteva portare a parto prematuro o alla morte del feto [19].

La malattia causata da **Variola minor** [3,15] era simile alla *major*: i sintomi costituzionali tendevano ad essere più lievi e il *rash* presentava un numero minore di lesioni ed un'evoluzione più rapida (1-2 settimane). La malattia aveva una letalità <1%.

6. GESTIONE DEI PAZIENTI, DEGLI ESPOSTI E DEI CONTATTI

6.1 Diagnosi clinica

La precocità del sospetto clinico e della eventuale diagnosi sono cruciali nella gestione della malattia. I CDC hanno sviluppato dei criteri per determinare il rischio di vaiolo e indirizzare la scelta dei test di laboratorio e la gestione dei campioni più appropriate, definendo una situazione ad alto e a basso rischio sulla base della presenza dei prodromi febbrili e del *rash* caratteristico [20] (Tabelle 2 e 3).

Delle malattie esantematiche che possono essere confuse con il vaiolo, la varicella - pur essendo generalmente meno grave - pone particolari problemi di dia-

Tabella 2 ■ VAIOLO: CRITERI DIAGNOSTICI

| |
|---|
| Criteri maggiori |
| <ul style="list-style-type: none"> - Lesioni cutanee classiche: profonde nel derma, stabili, rotonde, ben circoscritte; possono essere ombelicale, discrete, confluenti o semiconfluenti - Lesioni allo stesso stadio di sviluppo (tutte papule o vescicole o pustole) in qualsiasi area cutanea |
| Criteri minori |
| <ul style="list-style-type: none"> - Distribuzione centrifuga delle lesioni (più numerose al volto e alle estremità distali) - Comparsa delle prime lesioni sulla mucosa orale, sul volto, sulle avambraccia - Stato tossimico, terminale - Lenta evoluzione delle lesioni da macule a papule a pustole in molti giorni - Lesioni presenti su palme e piante |
| Fonte: [20] |

Tabella 3 ■ VAIOLO: DEFINIZIONE DEL RISCHIO DI MALATTIA

| |
|---|
| Rischio Alto |
| Prodromi febbrili (1-4 giorni prima della comparsa del rash) con febbre $>38,3^{\circ}\text{C}$ e almeno uno tra i seguenti sintomi: prostrazione, cefalea, dorsalgie, brividi, vomito, dolore addominale intenso e entrambi i criteri diagnostici maggiori |
| Rischio Moderato |
| Prodromi febbrili (1-4 giorni prima della comparsa del rash) con febbre $>38,3^{\circ}\text{C}$ e almeno uno tra i seguenti sintomi: prostrazione, cefalea, dorsalgie, brividi, vomito, dolore addominale intenso e almeno uno dei criteri diagnostici maggiori o Prodromi febbrili (1-4 giorni prima della comparsa del rash) con febbre $>38,3^{\circ}\text{C}$ e almeno uno tra i seguenti sintomi: prostrazione, cefalea, dorsalgie, brividi, vomito, dolore addominale intenso e almeno quattro dei criteri diagnostici minori |
| Rischio Basso |
| Assenza dei prodromi febbrili o Prodromi febbrili (1-4 giorni prima della comparsa del rash) con febbre $>38,3^{\circ}\text{C}$ e almeno uno tra i seguenti sintomi: prostrazione, cefalea, dorsalgie, brividi, vomito, dolore addominale intenso e meno di quattro dei cinque criteri diagnostici minori |
| Fonte: [20] |

gnosi differenziale (Tabella 4 v. pag. 210). Al sospetto clinico di vaiolo va sempre effettuato un test diagnostico per varicella. Il vaiolo in soggetti parzialmente immuni può, d'altra parte, essere lieve, con febbre meno comune, lesioni in minor numero e una più rapida guarigione [4]

Altra importante diagnosi differenziale è quella con la malattia da *Monkeypox virus*, presente in Africa con casi sporadici o piccoli *outbreak*; un'epidemia di 71 casi si è verificata negli Stati Uniti nel 2003 [4],

associata all'importazione di animali esotici. Prodromi e *rash* sono molto simili al vaiolo ordinario discreto o semiconfluente, ma in genere la malattia è lieve e si autorisolve: la letalità osservata in piccole epidemie varia dal 3 all'11% [21,22] ed il tasso di attacco secondario sarebbe del 7-15% tra i contatti familiari non vaccinati per il vaiolo [22]. Le lesioni cutanee sono generalmente superficiali e molto frequente è la presenza di linfadenopatia, non caratteristica di vaiolo o varicella.

La diagnosi clinica può risultare più difficile nelle forme di vaiolo maligno ed emorragico, quando non si sia a conoscenza dell'esistenza di un'epidemia in corso e della contemporanea presenza di casi di malattia ordinaria. Le forme emorragiche possono essere facilmente confuse con una

meningococcemia o una grave leucemia acuta [23].

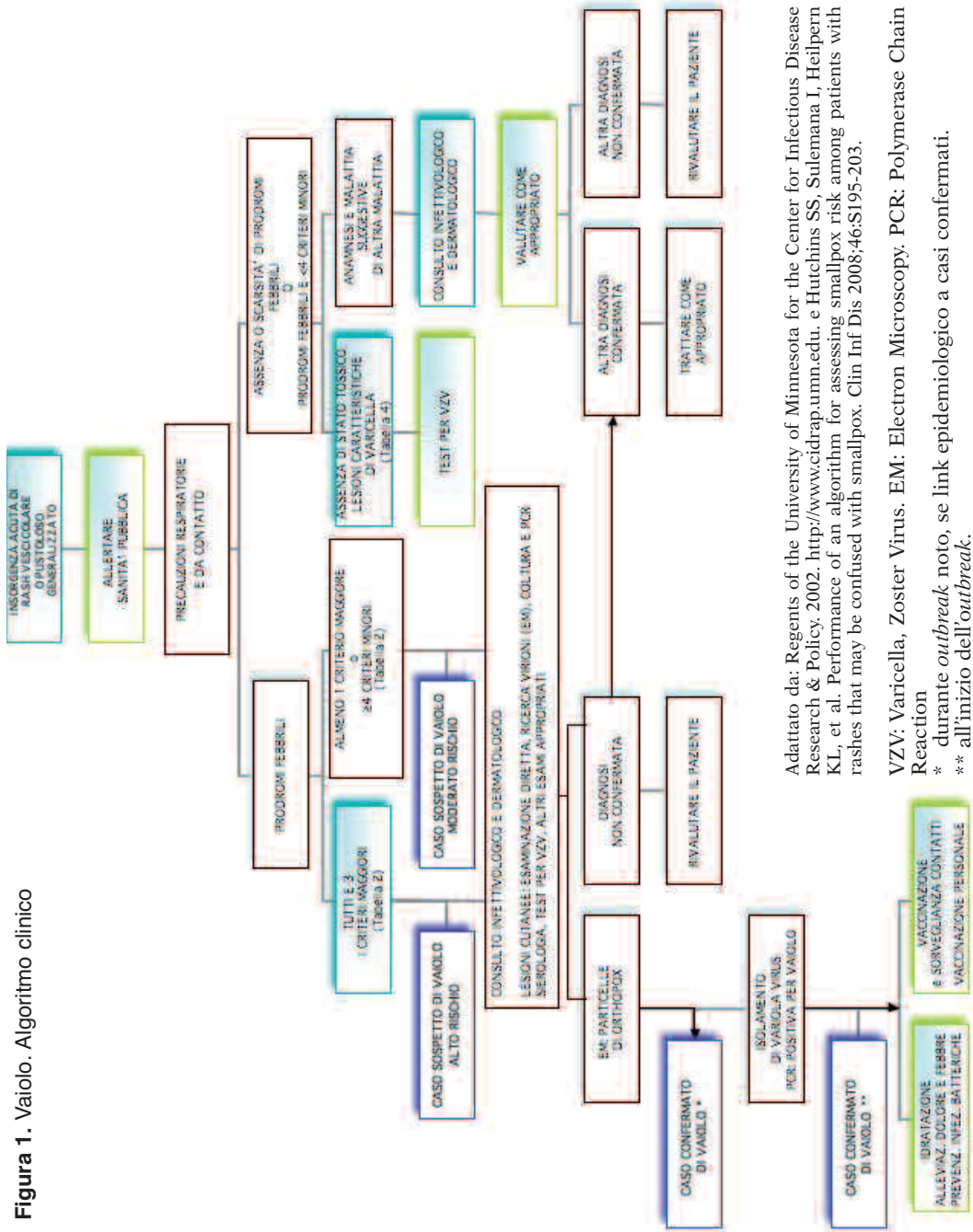
Sulla base della classificazione del rischio, i CDC hanno sviluppato un algoritmo per valutare rapidamente i pazienti per sospetto vaiolo e guidare le decisioni cliniche (Figura 1). L'algoritmo si propone

Tabella 4 ■ DIAGNOSI DIFFERENZIALE TRA VAIOLO E VARICELLA

| Caratteristiche | VAIOLO | VARICELLA |
|--|---|--|
| Periodo di incubazione | 7-17 giorni | 14-21 giorni |
| Prodromi | Febbre e malessere per 2-4 giorni prima del <i>rash</i> | Scarsi o assenti |
| Distribuzione del <i>rash</i> | Inizia alla mucosa orale, si espande al volto, quindi in pattern centrifugo; presente in genere su palme e piante | Inizia al tronco ed ha evoluzione centripeta; quasi mai presente su palme e piante |
| Tempo di comparsa del <i>rash</i> | 1-2 giorni | Compaiono a gruppi e possono essere a differenti stadi di maturazione in qualsiasi momento dell'osservazione |
| Evoluzione delle lesioni | Sincrona Progrediscono in 14-20 giorni da macule a papule a vescicole a pustole, quindi a croste | Asincrona Progrediscono rapidamente in 24 ore da macule a papule a vescicole; poi a croste in 4-7 giorni |
| Profondità delle lesioni | Si estendono nel derma | Superficiali |
| Separazione delle croste | 14-28 giorni dopo il <i>rash</i> | Entro 14 giorni dall'inizio del <i>rash</i> |
| Sensazione associata al <i>rash</i> | Può essere doloroso | Spesso intensamente prurítico |
| Gravità | Stato tossico | Lieve |
| Letalità | Fino al 50% | Raramente fatale |
| Epidemiologia | Tutte le fasce di età | Più frequente nei bambini |

Fonte: [4]

Figura 1. Vaiolo. Algoritmo clinico



Adattato da: Regents of the University of Minnesota for the Center for Infectious Disease Research & Policy. 2002. <http://www.cidrap.umn.edu>. e Hutchins SS, Sulemana I, Heilpern KL, et al. Performance of an algorithm for assessing smallpox risk among patients with rashes that may be confused with smallpox. Clin Inf Dis 2008;46:S195-203.

VZV: Varicella, Zoster Virus. EM: Electron Microscopy. PCR: Polymerase Chain Reaction

* durante outbreak noto, se link epidemiologico a casi confermati.
 ** all'inizio dell'outbreak.

un'elevata specificità dal momento che il vaiolo non esiste più allo stato endemico: con la classificazione a *rischio alto* si intende identificare il 90% della forma ordinaria di vaiolo, così come descritta nei pazienti ospedalizzati nell'era pre-eradicazione. L'algoritmo intende minimizzare i risultati falsi positivi limitando le indagini di laboratorio ai pazienti considerati ad alto rischio. Uno studio prospettico multicentrico ne ha esaminato la *performance* nella gestione di pazienti con *rash acuto generalizzato* vescicolare o pustoloso ammessi nei dipartimenti di emergenza di 12 ospedali di 6 stati statunitensi dal 2003 al 2005. È stato definito *rash acuto generalizzato* un *rash* comparso nei 7 giorni precedenti l'accesso in ospedale, caratterizzato da 20 e più lesioni, almeno 4 delle quali su testa e collo. La febbre non era richiesta tra i criteri di arruolamento. Dei circa 27.000 pazienti ammessi con *rash* (3,5% di tutti gli accessi), 89 (1,2 pazienti per 10.000 accessi) avevano un *rash acuto generalizzato* vescicolare o pustoloso e 73 sono stati arruolati nello studio: di essi nessuno è stato classificato dai medici partecipanti come a *rischio alto* di avere il vaiolo; 72 (99%) sono stati classificati a *rischio basso*; 1 paziente come a *rischio moderato*. Sono stati dimessi con diagnosi di varicella 55 pazienti (75%). Independentemente, i CDC hanno classificato gli stessi pazienti al computer sulla base della presenza dei criteri clinici maggiori e minori: 68 (86%) a *rischio basso*, 11 (14%) a *rischio moderato*. Gli 11 classificati a *rischio moderato* soddisfacevano 2 criteri clinici maggiori: 9 pazienti avevano prodromi febbrili con lesioni classiche, 2 pazienti prodromi febbrili con lesioni allo stesso stadio di sviluppo; la diagnosi di dimissione è stata varicella per 9 (82%) di essi. La concordanza tra medici e CDC nell'assegnazione del rischio è stata dell'84%.

In assenza di conferma di laboratorio, l'applicazione dell'algoritmo può risultare

in una perdita dei veri casi di vaiolo in forma atipica, che sarebbero classificati come a moderato o basso rischio: la specificità dell'algoritmo sarebbe quindi in realtà più bassa di quanto proposto. Tuttavia, modificazioni nell'algoritmo porterebbero a falsi allarmi: lo studio conferma l'alta specificità con cui l'algoritmo è stato pensato per riconoscere la forma ordinaria storicamente descritta, che assicura che 1 caso classificato ad alto rischio sia veramente un sospetto vaiolo. La sensibilità non può essere ovviamente valutata in assenza della malattia.

6.2 Diagnosi di laboratorio

Gli esami ematochimici non danno indicazioni di particolare ausilio in caso di vaiolo: linfocitosi relativa o assoluta e granulocitopenia possono essere presenti; segni di coagulazione intravascolare disseminata (trombocitopenia, deficit dei fattori della coagulazione, aumento del tempo di protrombina, ipofibrinogenemia) sono presenti nella forma emorragica.

Non sono disponibili sistemi commerciali atti alla rilevazione del virus del vaiolo o della risposta immune. I laboratori in grado di porre tale diagnosi sono in numero ristretto: in Italia il centro di riferimento è il laboratorio di Virologia dell'INMI "L. Spallanzani", che, a seguito di accordi internazionali, ha avuto l'opportunità di testare i suoi metodi di rilevazione presso il laboratorio CDC di Atlanta dove il virus è ancora conservato.

La diagnosi di laboratorio (Tabella 5) si basa principalmente sulla ricerca ed identificazione dell'agente nella fase acuta della malattia; la risposta anticorpale è tardiva e difficilmente differenziabile da quella suscitata dalla vaccinazione o da altre infezioni da *Orthopoxvirus*. Sebbene la presenza del virus possa essere dimostrata, in fase acuta, nelle secrezioni respiratorie, in genere il paziente giunge all'attenzione del clinico quando il *rash* è in fase vescico-

Tabella 5 ■ SCHEMA RIASSUNTIVO DEI CAMPIONI DA RACCOGLIERE E DEI RELATIVI ESAMI CHE VENGONO EFFETTUATI PER LA DIAGNOSI DI VAIOLO, E RELATIVO STATO DI MESSA A PUNTO DEI METODI

| Tipo di campione | Modalità di raccolta ed esecuzione | Tipo di analisi |
|---------------------|---|--|
| Lesione vescicolare | Raccogliere l'essudato sterilmente con una siringa. Una goccia va immessa nella provetta con tampone per l'estrazione degli acidi nucleici. Il resto va eventualmente esaminato al microscopio elettronico per la ricerca morfologica del virus | Ricerca acidi nucleici virali; ricerca di virioni in Microscopia Elettronica (ME) |
| Croste | Raccogliere con pinzetta sterile e porre, insieme con lo scraping lesionale, in terreno di trasporto per virus, in provetta di plastica con tappo a vite | Ricerca acidi nucleici virali; ricerca di virioni in ME |
| Sangue | 2 provette per sierologia in vacutainer infrangibili, una in fase acuta ed una in fase convalescente | Ricerca di anticorpi |

losa: il virus viene allora ricercato all'interno delle lesioni, mediante prelievo del liquido intralesionale, e successivamente nelle croste.

I metodi per la ricerca del virus si basano sull'amplificazione delle sequenze di acido nucleico virale, mediante PCR classica o Real-Time; sulla successiva caratterizzazione mediante sequenziamento nucleotidico; sull'identificazione presuntiva mediante analisi RFLP degli ampliconi; sulla rilevazione ed identificazione presuntiva mediante microscopia elettronica; sull'isolamento del virus su colture di tessuto.

Per la diagnosi differenziale da agenti virali responsabili di rash bollosi, alcuni sistemi consentono la rilevazione in parallelo, mediante Real-Time PCR multiplex, di *Orthopoxvirus*, *Varicella-zoster* e *Herpes simplex* [24]. Sono inoltre disponibili per *Varicella-zoster* e *Herpes simplex* metodi molecolari e sistemi di rilevazione anticorpale (IgG e IgM) commerciali: tuttavia, soprattutto per *Varicella-zoster*, un risultato negativo nelle fasi iniziali dell'esantema

non esclude l'infezione; la presenza di IgG in assenza di IgM, invece, consente di escludere l'infezione primaria.

Per quanto riguarda la microscopia elettronica, l'analisi del materiale proveniente dalle lesioni mediante colorazione negativa permette una rapida identificazione presuntiva di *Poxvirus*, ma non la distinzione tra i virus della famiglia, mentre permette la differenziazione, su base morfologica, dai virus erpetici.

È inoltre opportuno procedere all'isolamento virale su colture di tessuto, che avviene su vari tipi di colture cellulari (ad es. Vero). L'inoculo su membrana corioallantoidea di uovo embrionato di pollo è più sensibile, ma attualmente poco utilizzato e la morfologia delle lesioni che vi si sviluppano permette l'identificazione di vari *Poxvirus* e del virus della varicella.

Un test rapido per la diagnosi del vaiolo è stato inoltre sviluppato e brevettato presso l'INMI. Si tratta di un metodo rapido per la misurazione selettiva dei linfociti T specifici per il vaiolo, identificati tramite anticorpi monoclonali diretti verso la

superficie cellulare dei linfociti T o che si legano alle citochine che si accumulano a livello intracellulare. Il test viene eseguito utilizzando sangue intero, può essere eseguito in 8 ore ed è effettuabile anche su campioni di sangue criopreservati. Il test ha anche un'altra importante applicazione: permette di valutare i livelli di copertura vaccinale di intere popolazioni ed in futuro potrebbe essere applicato per la valutazione dell'efficacia di programmi di immunizzazione diversi dal vaiolo.

6.3 Gestione dei campioni biologici

I campioni biologici devono essere prelevati da personale recentemente (nei precedenti 3 anni) vaccinato (o vaccinato nello stesso giorno), possibilmente utilizzando soggetti sottoposti alla vaccinazione di massa in uso fino al 1978, per i quali è prevedibile una risposta immunitaria protettiva più rapida ed efficace in caso di esposizione. Devono essere utilizzati adeguati dispositivi di protezione individuale (DPI) (vedi 10.1).

Per prelevare il liquido di vescicole e pustole è necessario utilizzare la parte smussa di un bisturi e il materiale deve essere estratto utilizzando un tampone di cotone. Le croste devono essere rimosse con una pinza.

La raccolta, il trasporto e la manipolazione dei campioni biologici devono avvenire secondo le indicazioni per la gestione degli agenti di gruppo di rischio 4. I campioni devono essere posti in un contenitore a vuoto sigillato, a sua volta inserito in un secondo contenitore a tenuta per il trasferimento ai laboratori.

La gestione dei campioni biologici deve avvenire in laboratori BSL-4, ad opera di personale addestrato a tal fine. Ogni attività diagnostica che preveda la necessità di manipolare campioni che potrebbero contenere patogeni di gruppo 4 deve essere preventivamente concordata con il responsabile delle attività diagnostiche dell'emergenza dell'Istituto Nazionale per le Malattie Infettive "L. Spallanzani". Ove possibile si deve procedere alla preventiva inattivazione della infettività virale.

genza dell'Istituto Nazionale per le Malattie Infettive "L. Spallanzani". Ove possibile si deve procedere alla preventiva inattivazione della infettività virale.

7. TRATTAMENTO

Il trattamento del vaiolo si basa principalmente su misure di supporto:

- mantenimento di un appropriato equilibrio idrosalinico;
- trattamento del dolore e della febbre;
- adeguata pulizia ed asepsi delle lesioni per la prevenzione di superinfezioni batteriche.

Nell'era pre-eradicazione non era disponibile alcuna terapia farmacologica specifica di dimostrata efficacia.

Diversi farmaci antivirali sono stati studiati o sono in studio come approcci terapeutici all'infezione:

- cidofovir si è dimostrato attivo contro diversi *Orthopoxvirus*, incluso il virus del vaiolo [25]; inoltre, in forma aerosolizzata, sembra proteggere i topi dall'infezione con *Cowpox* [26];
- SIGA-246, un composto a basso peso molecolare attivo contro diversi *Orthopoxvirus* sembra proteggere i primati dal vaiolo, si è mostrato sicuro nell'uomo ed è in fase II di sperimentazione [27];
- l'uso di anticorpi monoclonali contro la proteina B5 del virus vaccinico sembra inibire la disseminazione di *Vaccinia* e *Variola* nelle cavie e potrebbe essere utile nel trattare le complicazioni della vaccinazione [28].

8. SORVEGLIANZA

In presenza di febbre e *rash* vescicolare o pustoloso il paziente va messo in isolamento secondo le indicazioni riportate nel paragrafo 10.1 "Misure di Isolamento" e andrebbe comunque eseguito un test per la ricerca degli anticorpi verso *Varicella Zoster Virus*.

Una volta posto il sospetto di vaiolo vanno attuate le seguenti procedure:

- valutazione del rischio di malattia secondo le indicazioni riportate nel Paragrafo 6.1: “Diagnosi clinica”;
- allerta della Sanità Pubblica secondo le modalità riportate nel Paragrafo 9: “Allerta della Sanità Pubblica”;
 - richiesta consulenze infettivologica e dermatologica;
 - invio campioni biologici per la diagnosi di laboratorio.

8.1 Definizione di caso

Descrizione clinica

Malattia caratterizzata dall'improvvisa comparsa di febbre > 38,3°C con *rash* cutaneo caratterizzato da vescicole o pustole tese nella stessa fase di evoluzione, senza altra causa apparente [10].

Criteri di laboratorio

- individuazione del DNA di *Variola virus* in campione clinico mediante PCR;
- isolamento di *Variola virus* da campione clinico e conferma mediante PCR [10].

8.2 Classificazione dei casi

Sospetto:

- caso con *rash* febbrile, precedendo la febbre lo sviluppo del *rash* di 1-4 giorni

Probabile:

- caso che rientra nella definizione clinica, o che non vi rientra, ma è clinicamente compatibile con il vaiolo ed è legato epidemiologicamente ad un caso confermato. Si tratta ad esempio della forma emorragica, del tipo piatto e del vaiolo *sine eruptione*.

Confermato:

- caso di vaiolo confermato in labora-

torio, o caso che rientra nella definizione clinica, epidemiologicamente legato ad un caso confermato in laboratorio.

9. ALLERTA DELLA SANITÀ PUBBLICA

Tutti i casi sospetti o accertati di vaiolo vanno immediatamente notificati secondo la normativa vigente (Malattie Infettive di Classe I, DM 15.12.90). La segnalazione va inviata entro 12 ore al Ministero della Salute, Direzione Generale della Prevenzione Sanitaria - Ufficio V - Malattie Infettive e Profilassi Internazionale, ai seguenti numeri: tel. 06.59943905 - 06.59943481 - 06.59943925 - 06.59943805 - fax 06.59943096. Inoltre, nel sospetto di atto bioerroristico, secondo le indicazioni del Ministero della Salute Unità di Crisi (prot. 400.3/120.33/4545 del 12/10/2001) [58], va compilata la “Scheda di notifica di stato morboso causato da agenti biologici, fisici e chimici usati a scopi aggressivi”.

9.1 Misure nei confronti degli esposti e dei contatti

I contatti vengono definiti come soggetti che [23]:

- hanno avuto un contatto faccia a faccia con un caso sospetto o confermato dopo la comparsa della febbre;
- hanno avuto un contatto a distanza inferiore di 2 metri con un caso sospetto o confermato dopo la comparsa della febbre;
- hanno condiviso la stessa abitazione con un caso sospetto o confermato dopo la comparsa della febbre.

I contatti e i soggetti esposti o con presunta esposizione che presentano febbre con o senza *rash* vanno immediatamente vaccinati e isolati secondo le indicazioni descritte nel paragrafo 10.1 “Misure di Isolamento” [10,23].

I contatti e i soggetti esposti o con presunta esposizione asintomatici vanno

immediatamente vaccinati e posti sotto sorveglianza per 18 giorni dall'accertata o presunta esposizione o per 14 giorni dalla vaccinazione, con le seguenti indicazioni [10]:

- misurare la temperatura due volte al giorno, con una misurazione effettuata la sera;
- continuare le normali attività quotidiane;
- rimanere nella propria città;
- mantenere un contatto telefonico giornaliero con il presidio sanitario di riferimento;
- contattare immediatamente il presidio sanitario di riferimento se la temperatura corporea è $\geq 38^{\circ}\text{C}$ e rimanere nella propria abitazione in attesa dell'intervento dei sanitari.

I contatti e i soggetti esposti o con presunta esposizione asintomatici che durante i 18 giorni di sorveglianza presentino una temperatura corporea $\geq 38^{\circ}\text{C}$ vanno trattati come casi sospetti, immediatamente posti in isolamento [10,23].

10. MISURE DI CONTROLLO

10.1 Misure di isolamento

La trasmissione nosocomiale dell'infezione può avvenire attraverso *droplet* e il contatto con il virus da lesioni cutanee [59] o, raramente, da aerosol. In un episodio avvenuto in Germania un paziente con tosse, isolato in stanza singola, trasmise la malattia a soggetti presenti su tre piani differenti dell'ospedale [5]. Inoltre, la difficoltà diagnostica e l'alta infettività delle forme emorragiche e maligne aumentano il rischio di trasmissione nosocomiale. Le misure di controllo dell'infezione in ambito nosocomiale comprendono quindi quelle previste dal cosiddetto "alto isolamento": precauzioni standard, da contatto, da *droplet* ed aeree [59]. Essendo la trasmissione aerea possibile, ma rara, si raccomandano precauzioni aeree quando e dove possibile, fermo restando che in un evento di massa

precauzioni di barriera e isolamento entro l'area designata assumono un ruolo più importante [59].

Il paziente con vaiolo è contagioso dal momento dello sviluppo del *rash*, che può essere difficile da riconoscere nelle fasi iniziali: tuttavia l'isolamento del caso dal momento di comparsa della febbre (che in genere precede l'insorgenza del *rash*) assicura che le idonee precauzioni siano messe in atto al momento di inizio del periodo infettivo [10]. Le precauzioni andranno adottate fino al distacco di tutte le croste (circa 3-4 settimane) [59].

Il paziente va posto in stretto isolamento in stanza singola. In presenza di più casi sospetti di vaiolo, essi potranno essere posti nella stessa area della struttura (*cohorting*) per minimizzare il rischio di trasmissione ad altri pazienti [10].

In Italia l'Istituto Nazionale per le Malattie Infettive-IRCCS "L. Spallanzani" di Roma e l'Ospedale "L. Sacco" di Milano sono designati quali Centri di Riferimento per l'Emergenza Infettivologica.

Il reparto ed i locali di isolamento dovranno essere ubicati in edifici separati dal resto dell'ospedale o, almeno, avere un accesso separato e possibilmente un percorso dedicato fino alla stanza di degenza. L'unità destinata all'isolamento dei pazienti deve essere costituita da più stanze singole, dotate di servizi igienici e con interfono per le comunicazioni con l'ambiente esterno. All'interno di tale unità, dovranno essere predisposti locali da adibire a spogliatoio per il personale con docce e lavandini per il lavaggio delle mani. Nel caso in cui l'accesso alle stanze di degenza avvenga tramite un unico corridoio, è opportuno, per motivi di sicurezza ed esigenze organizzative, evitare il ricovero di pazienti con altre patologie nelle stanze limitrofe.

Le stanze di degenza debbono essere dotate di sistemi monitorati di ventilazione che assicurino una pressione negativa e

almeno 6 ricambi di aria/ora [4]. L'accesso alle stanze di isolamento, ristretto al personale necessario, dovrà avvenire attraverso una zona filtro costituita da una stanza o anticamera a tenuta d'aria, ove le caratteristiche delle strutture lo consentano. Le zone filtro delle stanze debbono essere a pressione negativa rispetto ai corridoi, dotate di lavandini per il lavaggio e la disinfezione delle mani e degli idonei DPI. L'aria in uscita deve essere sottoposta a filtrazione con filtri *High Efficiency Particulate Air* (HEPA) [4].

Il personale sanitario dovrà indossare un filtrante respiratorio di tipo FFP2 o di più alto livello protettivo per entrare nella stanza del paziente con sospetto o accertato vaiolo, anche se vaccinato, soprattutto nella possibilità di ceppi geneticamente resistenti (come da attacco bioterroristico) o di esposizione a cariche virali elevate (procedure generanti aerosol, pazienti immunocompromessi, vaiolo emorragico o confluyente) [59].

Per quanto riguarda le precauzioni da contatto, le lesioni cutanee dei pazienti andranno coperte per prevenire l'aerosolizzazione o il contatto con il virus [59]. Il personale deve indossare guanti e camice entrando nella stanza, cambiare i guanti dopo ogni contatto con materiale potenzialmente infettivo, rimuovere guanti e camice prima di lasciare la stanza e lavare immediatamente le mani con un antimicrobico [4]. Quando possibile, gli strumenti per l'assistenza al paziente devono essere dedicati [4]. Particolare attenzione deve essere posta nelle fasi di rimozione dei DPI per evitare di contaminarsi.

Nei limiti del possibile, l'assistenza a un paziente con sospetto o accertato vaiolo deve essere assicurata da personale vaccinato. La vaccinazione del personale, preferibilmente già vaccinato durante la campagna di massa in uso fino agli anni '70, in preparazione alla possibile esposizione riveste un ruolo cruciale nel controllo del-

l'infezione e deve essere effettuata il prima possibile.

I sanitari nuovamente sottoposti a vaccinazione dovrebbero coprire il sito di inoculazione con garze o fasce semipermeabili fino al sollevamento e alla caduta della lesione (circa 21 giorni) ed osservare una scrupolosa igiene delle mani: in caso di eventi avversi da vaccino, ad esempio per involontaria autoinoculazione, lesioni oculari (blefarite, congiuntivite), *vaccinia generalizzata* o progressiva, *eczema vaccinatum*, o superinfezione batterica con essudato, andranno adottate precauzioni standard e da contatto fino alla formazione di croste [59]. Particolare attenzione andrà posta nell'assistenza a pazienti ad alto rischio [59]. Nel programma di vaccinazione pre-esposizione del 2002-2005 negli Stati Uniti di 760.000 militari e 40.000 civili, inclusi 70.000 operanti in ambiente sanitario, non furono segnalati eventi avversi da vaccino negli ambienti sanitari [59]. Vi furono 53 casi di trasmissione del virus (di cui due terzi) da militari vaccinati, che non avevano seguito le raccomandazioni di copertura del sito di vaccinazione, a contatti stretti: tutti guarirono senza complicazioni [59].

La vaccinazione dei soggetti suscettibili, compresi i sanitari, a seguito di un contatto non protetto, dovrebbe essere effettuata entro 4 giorni dall'esposizione [59].

Nel contesto di un'epidemia su larga scala, quando non vi sia un numero di strutture adeguate a far fronte ai numerosi casi, potrebbe essere necessario isolare i pazienti che non necessitano di ospedalizzazione nella propria abitazione [10].

Le persone con estese lesioni cutanee non facilmente copribili (ad esempio facciali) o secernenti, o con sintomi respiratori, dovrebbero essere isolate in una stanza o in una zona separata dagli altri membri della famiglia. Per movimenti al di fuori dell'area di isolamento, una maschera chirurgica dovrebbe essere indossata se ci sono sintomi respiratori. Le lesioni della

pelle dovrebbero essere coperte il più possibile (maniche e pantaloni lunghi) per minimizzare il rischio di contatto con altri. I membri della famiglia che entrano nella stanza o nella zona dovrebbero indossare una maschera chirurgica; dovrebbero essere utilizzati guanti usa e getta per ogni contatto diretto con il paziente. Persone che non hanno avuto contatto con la persona malata non dovrebbero entrare nella casa. Il personale sanitario e gli altri che devono entrare nella casa per curare il paziente dovrebbero indossare un filtrante respiratorio FFP2 o di più alto livello protettivo.

Scrupolosa igiene delle mani (lavarsi le mani con acqua calda e sapone o utilizzare un detergente ad alcol) dovrebbe essere seguita dalle persone infette e da chi è in contatto con loro frequentemente e, in particolare, dopo aver toccato parti del corpo, vestiti, lenzuola, o altre superfici ambientali che possono essere stati in contatto con le lesioni infettive.

Il lavaggio della biancheria (lenzuola, asciugamani, vestiario) può essere effettuato in una normale lavatrice con acqua calda e detergente; si può aggiungere varechina ma non è necessario. Si dovrebbe prestare attenzione quando si maneggia biancheria sporca per evitare contatto diretto con materiale contaminato. La biancheria sporca non dovrebbe essere sbattuta o manipolata in modo da spargere particelle infettive.

I piatti e gli utensili da cucina non dovrebbero essere condivisi e, se usati dalla persona infetta, lavati con acqua calda e sapone.

Le superfici contaminate dovrebbero essere pulite e disinfettate. Possono essere utilizzati i normali disinfettanti e detergenti domestici secondo le istruzioni dei produttori. Il vestiario, le bende e altro materiale contaminato dalle lesioni infette dovrebbe essere messo in una borsa separata e posto nell'apposito contenitore per

l'eliminazione assieme ad altri rifiuti domestici.

10.2 Trasporto del paziente

Gli spostamenti del paziente con vaiolo sospetto o confermato andranno programmati e limitati a strette necessità assistenziali: il paziente indosserà una mascherina chirurgica per ridurre la dispersione dei *droplet* e il personale un filtrante respiratorio FFP2 o di più alto livello protettivo.

Il trasporto dei pazienti dovrà essere preferibilmente effettuato per mezzo di barelle-isolatori pressurizzati, dotate di filtri HEPA. In caso di mancanza di tali dispositivi di trasporto, le parti del veicolo o dell'aeromobile maggiormente esposte a contatto con il paziente ed i suoi escreti, dovranno essere rivestite di fogli di plastica, al fine di facilitare le successive operazioni di pulizia e disinfezione [31]. Dopo il trasporto, i mezzi utilizzati dovranno essere puliti, mediante sfregamento con soluzione di ipoclorito o, preferibilmente, con soluzioni di fenolo, risciacquandole dopo un contatto di almeno 30 minuti; si procederà successivamente a disinfezione gassosa con vapori di formaldeide. La disinfezione con formaldeide è altamente sconsigliata nel caso di aeromobili, per il rischio di reazioni chimiche con la strumentazione di bordo [31].

10.3 Sanificazione ambientale e gestione dei materiali infetti

Il virus del vaiolo è stabile se liofilizzato, congelato o semplicemente conservato in glicerina [31].

Nelle croste il virus del vaiolo è stabile, potendo persistere per 3 settimane a 35°C con umidità relativa del 65%; a 26°C resiste per 8 settimane e per 12 settimane in ambiente molto secco (umidità relativa <10%). Viene inattivato dal riscaldamento a 55°C per 30 minuti [31]. Poiché il virus vaccinico esposto ai raggi ultravioletti viene inattivato in 24 ore (se non protetto

da materiale organico), si ritiene che *Variola major* si comporti nello stesso modo [31].

I materiali tessili provenienti dal paziente, dai contatti stretti e dagli esposti dovranno essere maneggiati avendo cura di provocare la minima agitazione degli stessi al fine di prevenire la dispersione di piccoli residui cutanei. Devono essere raccolti secondo le procedure standard (doppio sacco di cui l'interno idrosolubile) e autoclavati prima di essere lavati o inceneriti. I materiali contaminati da secrezioni e fluidi biologici di persone infette vanno inceneriti o autoclavati a temperature di 120°C; è possibile impiegare soluzioni di ipoclorito al 10% di cloro disponibile (10.000 ppm) o disinfettanti a base di ammonio quaternario, oppure altre soluzioni disinfettanti: formaldeide al 4% (formalina al 10%) oppure glutaraldeide al 4% (ph 8-8,5) [31].

Le misure previste dalle Precauzioni Standard per la sanificazione ambientale e la gestione di biancheria, effetti lettereci, altri materiali infetti sono valide anche in caso di sospetta o accertata infezione da virus del vaiolo.

Quando possibile, i presidi assistenziali non critici devono essere dedicati al singolo paziente (o a pazienti con la stessa malattia); se è necessario riutilizzarli, non devono essere usati per l'assistenza ad un altro paziente prima che vengano sottoposti a pulizia e decontaminazione appropriata.

10.4 Informazioni per i pazienti, parenti e visitatori

Deve essere preparato e distribuito materiale informativo che includa la descrizione chiara della sintomatologia e le sedi assistenziali cui rivolgersi per la valutazione in caso sia riconosciuta tale sintomatologia. Devono essere specificati i dettagli riguardo il tipo e la durata dell'isolamento. Devono essere date informazioni sulla vac-

cinazione e i possibili effetti collaterali. Misure estreme come l'incenerimento o la bollitura dei materiali potenzialmente contaminati devono essere scoraggiate.

11. VACCINO

La prima strategia di vaccinazione per il vaiolo fu intrapresa nel tardo '600 attraverso un processo chiamato "variolizzazione", che consisteva nell'iniettare in un soggetto sano materiale prelevato da pustole di un soggetto malato in via di guarigione: il virus non era attenuato e gravi erano gli effetti collaterali associati alla pratica, con il rischio di trasmissione della malattia da parte del soggetto vaccinato a persone suscettibili e con un tasso di letalità del 0,5-2% [4]. Nel 1796 Edward Jenner si accorse che le donne addette alla mungitura, che frequentemente contraevano il vaiolo bovino, difficilmente venivano colpite da quello umano. Iniziò così la diffusione del vaccino costituito da *Cowpox virus*, sostituito poi dal virus vaccinico (*Vaccinia*) - geneticamente distinto dal *Cowpox* - la cui origine resta sconosciuta: potrebbe essere derivato dal *Cowpox* attraverso vari passaggi in coltura o rappresentare un ulteriore *Orthopoxvirus* estinto in natura [4].

In Italia, fu Luigi Sacco a diffondere, dal 1799, la vaccinazione nella Repubblica Cisalpina, riducendo drasticamente la mortalità da vaiolo. Nel 1956 l'OMS incominciò il primo programma di eradicazione della malattia, intensificando alla fine degli anni '60 la campagna di vaccinazione di massa in ogni paese endemico e implementando una strategia mirante a vaccinare rapidamente le persone venute a contatto con casi di vaiolo (*ring vaccination*). Questa nuova fase venne chiamata *Global Intensified Eradication Program* (1967-1977). Negli Stati Uniti, l'ultimo caso si era verificato nel 1949 [29]. L'8 Maggio 1980, l'OMS dichiarò eradicata la malattia.

La vaccinazione antivaiolosa è stata sospesa in Italia nel 1977 e definitivamente abrogata con una legge del 1981: la vaccinazione fu considerata non più necessaria per la prevenzione e venne stimato che gli effetti indesiderati fossero a quel punto più probabili e pericolosi rispetto al rischio di contrarre la malattia, ormai remoto considerando il livello di immunità raggiunto su scala mondiale. In anni recenti, solo personale che lavora con virus simili al vaiolo in ambienti di ricerca ha ricevuto la vaccinazione [30].

Dopo l'11 settembre 2001 il governo statunitense ha cominciato a produrre nuove dosi di vaccino per essere in grado di immunizzare la popolazione americana nel caso di una nuova epidemia di vaiolo, e nel dicembre 2002 il presidente degli Stati Uniti ha offerto ai cittadini americani la possibilità di vaccinarsi contro il virus del vaiolo. A fine marzo 2003 sono stati vaccinati oltre 350.000 americani, tra civili appartenenti alle istituzioni sanitarie e militari impegnati in azioni di guerra in Iraq.

Il vaccino antivaioloso attualmente non viene prodotto in Italia [31]. Date le complicanze possibili, il Ministero sconsiglia una vaccinazione estesa alla popolazione in assenza di pericolo imminente [30].

Il vaccino del vaiolo finora utilizzato (Dryvax, Wyeth Pharmaceuticals, Inc., Marietta, Pennsylvania) è una preparazione liofilizzata di virus vaccinico prodotta attraverso l'inoculazione del virus nei bovini e la successiva estrazione di materiale purulento dalle lesioni prodotte. Il vaccino contiene, inoltre, polimixina B, streptomina, tetraciclina e neomicina. La maggior parte delle dosi di vaccino sono state prodotte e conservate durante gli anni '70. Per far fronte ad un'eventuale emergenza, numerosi sono stati gli studi condotti al fine di verificare l'efficacia del vaccino qualora questo venga diluito, allo scopo di avere a disposizione un numero maggiore

di dosi [32-37]: alle diluizioni 1:5 e 1:10 non vi sarebbe una significativa perdita di efficacia.

Il vaccino è in grado di stimolare sia l'immunità cellulo-mediata, con controllo della replicazione virale locale, sia l'immunità umorale che, attraverso anticorpi neutralizzanti, controlla la disseminazione del virus [38].

L'efficacia della vaccinazione primaria è dimostrata dalla comparsa dopo 7 giorni di una lesione vescicolare o pustolosa nel sito di vaccinazione mentre l'efficacia della rivaccinazione è dimostrata da una infiammazione palpabile nel sito di inoculazione dopo 6-8 giorni [39]. La presenza di una reazione cutanea localizzata correla con lo sviluppo di anticorpi neutralizzanti, che appaiono 10 giorni dopo la vaccinazione e 7 giorni dopo la rivaccinazione [39]. Un titolo di anticorpi inibenti l'emoagglutinazione o neutralizzanti $\geq 1:10$ si sviluppa nel 95% dei vaccinati e sembra conferire protezione, ma nessuno studio ha valutato questa correlazione sul campo [39].

La durata dell'immunità non è mai stata misurata adeguatamente. Alcuni studi epidemiologici suggeriscono una protezione per 5-10 anni dopo la vaccinazione primaria: anticorpi neutralizzanti con titolo $\geq 1:10$ sono stati riscontrati nel 75% di soggetti 10 anni dopo aver ricevuto due dosi di vaccino e 30 anni dopo aver ricevuto tre dosi [39]. Il 20% dei soggetti vaccinati prima degli anni '70 avrebbe, oggi, una protezione adeguata [23]. Un recente studio ha suggerito l'utilità di effettuare un test intradermico con virus vaccinico inattivato al fine di predire l'immunità residua (specificità 97%, sensibilità 85%) [40].

I successivi paragrafi si riferiscono alle numerose osservazioni desunte nei soggetti vaccinati con vaccino Dryvax; è stato recentemente disposto di distruggere le scorte disponibili del vaccino entro il 29 febbraio 2008. Il vaccino, creato negli ulti-

mi anni del XVIII secolo, è stato sostituito dal vaccino ACAM2000 (Acambis, Inc, Cambridge, Massachusetts), un vaccino vivo contenente *Vaccinia virus* approvato per l'uso negli Stati Uniti dalla Food and Drug Administration in agosto 2007, derivato dal vaccino Dryvax [4]. Un trial clinico di fase 2 ha dimostrato che alla dose unica di $6,8 \times 10^7$ pfu/mL, ACAM2000 induce una sufficiente risposta immune nel 94% dei soggetti, comparabile all'efficacia ottenuta con il Dryvax; è inoltre coltivato in colture cellulari, nella speranza di produrre un vaccino più sicuro con un minor rischio di causare gravi complicazioni.

Numerosi sono gli studi che indagano lo sviluppo di nuovi vaccini allo scopo di aumentare la sicurezza della vaccinazione. Importanti risultati si stanno ottenendo con l'uso di virus vaccinici altamente attenuati o difettivi, di vaccini a DNA che contengano geni virali come immunogeni e di vaccini con subunità ricombinanti [41-44].

11.1 Utilizzo del vaccino in profilassi pre e post-esposizione

Negli Stati Uniti la vaccinazione pre-esposizione è raccomandata per [4,39,45]:

- personale di laboratorio e medico che possa venire a contatto diretto con colture di virus vaccinico, materiali infetti, virus vaccinici ricombinanti, altri *Orthopoxvirus* in grado di infettare l'uomo, o con animali infettati con virus vaccinico non attenuato o altri *Orthopoxvirus* in grado di infettare l'uomo;
- personale designato a condurre indagini che prevedano il contatto diretto con casi sospetti di vaiolo. È raccomandata l'identificazione di specifici *team* militari e medici per far fronte all'emergenza nelle fasi iniziali. Ogni Dipartimento di Emergenza dovrebbe quindi identificare uno specifico e multidisciplinare *team* di sanitari,

addetti alla sicurezza, ausiliari che siano vaccinati e addestrati alla gestione dei casi sospetti di vaiolo;

- personale responsabile della somministrazione del vaccino;
- personale militare a rischio.

Secondo le indicazioni riportate dal *Center for Infectious Disease Research & Policy (CIDRAP)* [4], nel caso di sospetto evento da rilascio intenzionale si deve provvedere immediatamente all'identificazione dei contatti e di coloro che potrebbero essere stati esposti. L'immunità si sviluppa in 8-11 giorni dopo la vaccinazione: poiché il periodo di incubazione del virus è in media di 12 giorni, l'immediata vaccinazione a seguito di sospetta o confermata esposizione può essere efficace e dovrebbe avvenire entro 4 giorni dall'esposizione [4], ma i risultati sull'utilità sono contrastanti [47,48]. La vaccinazione post-esposizione sarebbe particolarmente utile per coloro che sono stati vaccinati in passato, essendo prevedibile una risposta immunitaria anamnesticca più rapida con la rivaccinazione [23].

In particolare, la vaccinazione andrebbe effettuata nei seguenti gruppi di soggetti [10]:

- soggetti esposti al rilascio del virus;
- soggetti che abbiano avuto contatti stretti (faccia a faccia o a distanza <2 metri) e persone che condividono la stessa abitazione con un caso confermato o sospetto dalla comparsa della febbre alla caduta delle croste;
- personale sanitario, forze dell'ordine e qualsiasi soggetto il cui lavoro possa esporlo al virus;
- personale di laboratorio selezionato per la processazione dei campioni provenienti da casi sospetti o confermati;
- soggetti con aumentata probabilità di contatto con materiale proveniente da un soggetto malato, come personale addetto alla lavanderia o alla raccolta dei rifiuti medicali;

- la vaccinazione deve essere presa in considerazione in tutti i soggetti presenti nell'ospedale nel periodo in cui era presente un caso non ancora appropriatamente isolato.

Coloro che presentano controindicazioni al vaccino (vedi paragrafo 11.3), ma rientrano in queste categorie, dovrebbero essere comunque considerati per la vaccinazione [10].

11.2 Somministrazione del vaccino

La vaccinazione consiste in una singola dose seguita da un richiamo ogni 10 anni.

Un richiamo ogni 3 anni [39] è consigliato per coloro che lavorano con virus vaccinici non attenuati, virus ricombinanti derivati da virus vaccinici non attenuati e altri *Orthopoxvirus* come *Monkeypox*. Prima della somministrazione del vaccino vanno ricercate eventuali controindicazioni [49]. Il vaccino va somministrato attraverso un ago biforcuto, preferibilmente a livello del deltoide e dell'avambraccio, con tre rapide inserzioni alla prima vaccinazione, 15 nella rivaccinazione.

La risposta alla vaccinazione va valutata dopo 6-8 giorni osservando la comparsa della tipica reazione: dopo 3-5 giorni compare nel sito una papula rossa, che evolve in vescicola in 5-8 giorni, quindi in pustola raggiungendo le maggiori dimensioni in 8-10 giorni. Successivamente si forma una crosta che cade dopo 14-21 giorni lasciando una cicatrice depressa.

È stata descritta la persistenza di virus vaccinico nel sito di inoculo fino a 21 giorni dopo l'avvenuta vaccinazione [50]. Particolare attenzione va posta nella cura del sito di vaccinazione, onde evitare l'autoinoculazione e la trasmissione per contatto a persone suscettibili: la zona va coperta con garze da cambiare ogni 1-2 giorni e il vaccinato va istruito a lavare le

mani con acqua e sapone dopo ogni contatto con la zona o con le garze contaminate [51].

11.3 Controindicazioni

La vaccinazione con virus vaccinico è controindicata in persone con le seguenti condizioni o familiari di soggetti con le seguenti condizioni [4,51-53]:

- eczema o dermatite atopica, anche se la condizione è lieve o non attiva, per l'aumentato rischio di eczema da virus vaccinico;
- condizioni cutanee con lesioni esfoliative acute o croniche (ustioni, impetigine, varicella, dermatite da contatto, *herpes simplex* o *zoster*, acne severa, psoriasi);
- immunodeficit naturali o acquisiti: infezione da HIV, tumori ematologici o di organi solidi disseminati, trapianti di cellule staminali o organi solidi, immunodeficit ereditari, malattie autoimmuni. Un vaccino è stato sviluppato per l'uso in stati di immunocompromissione [54];
- trattamenti immunodepressivi: agenti alchilanti, chemioterapici, radiazioni, corticosteroidi; persone trattate con corticosteroidi ad alte dosi (≥ 20 mg/die prednisone per almeno 14 giorni) non dovrebbero essere vaccinate per 1 mese dal completamento della terapia; persone trattate con altri agenti immunodepressivi negli ultimi 3 mesi non dovrebbero essere vaccinate;
- gravidanza o donne che hanno in programma un concepimento nel mese successivo: la vaccinazione può causare aborto o morte perinatale. In un'emergenza bioterroristica, la vaccinazione va considerata in donne in gravidanza ad alto rischio di esposizione;
- allattamento;

- reazioni di ipersensibilità a componenti del vaccino;
- persone sotto i 18 anni di età in situazioni di non emergenza;
- malattia cardiaca, anche non sintomatica, o con tre o più fattori maggiori di rischio per patologie cardiache: ipertensione, diabete, ipercolesterolemia, malattia cardiaca in familiare di primo grado in età inferiore ai 50 anni, fumo.

È stato proposto l'uso di immunoglobuline verso il virus vaccinico in profilassi per pazienti con controindicazioni [55]. Le limitazioni all'uso derivano dalla mancanza di dati di efficacia, dalla scarsa disponibilità e dagli effetti collaterali associati (dolore locale, cefalea, mialgie, febbre, sintomi gastrointestinali, dorsalgie, insufficienza renale e anafilassi) [51].

11.4 Reazioni avverse e loro trattamento

La vaccinazione antivaiole può provocare reazioni locali, con dolore ed eritema o infezioni batteriche secondarie nel sito di vaccinazione e sistemiche, con febbre, malessere, mialgie, cefalea. In casi più gravi, possono verificarsi reazioni dermatologiche generalizzate quali eritema multiforme e sindrome di Steven-Johnson.

Altre reazioni avverse sono le seguenti [4]:

- autoinoculazione involontaria in altra zona corporea;
- infezione generalizzata da virus vaccinico: vescicole o pustole in zone cutanee distanti dal sito di vaccinazione;
- *eczema vaccinatum*: diffusione locale o sistemica di virus vaccinico; può essere grave, fino alla morte;
- cheratite vaccinica;
- vaccinia progressiva: necrosi nell'area della vaccinazione, spesso con lesioni metastatiche ad altri siti; può essere grave, fino alla morte;

- encefalite post-vaccinica;
- infezione vaccinica fetale: dopo la prima inoculazione in donne gravide; risulta generalmente in aborto o morte perinatale;
- miopericardite vaccinica: tale evento avverso è stato osservato durante l'ultima ondata di vaccinazione, negli Stati Uniti, in seguito al programma speciale del governo Bush attuato a partire dal 2002. Su oltre 1 milione di militari vaccinati, sono stati osservati 140 casi di miopericardite [4,30];
- infarto del miocardio: osservati 18 casi tra i vaccinati recentemente negli Stati Uniti [4].

Le morti in seguito a vaccinazione sono stimate in 1,1 per milione di primi vaccinati e sembrano correlate con il ceppo usato per la vaccinazione [4].

Le più importanti reazioni avverse conseguenti alla vaccinazione primaria e loro gestione sono riportate in Tabella 6 (*v. pag. 224*). I tassi di effetti collaterali sono tratti da osservazioni negli Stati Uniti [56,57].

La terapia delle reazioni avverse si basa sull'uso delle immunoglobuline specifiche contro il virus vaccinico (IGV). La Food and Drug Administration nel 2005 ha approvato il loro uso nelle seguenti condizioni [4]: infezione aberrante da virus vaccinico per inoculazione accidentale, in particolare negli occhi (esclusa la cheratite isolata) e nel cavo orale; *eczema vaccinatum*, *vaccinia* progressivo, *vaccinia* generalizzato; infezione da virus vaccinico in individui con lesioni o malattie cutanee.

Altra alternativa, sperimentale, è il cidofovir, ma non vi sono dati conclusivi di efficacia [4].

Vidarabina e trifluridina, antivirali topici oftalmici, sono stati impiegati con successo nella terapia delle infezioni della cornea e della congiuntiva [4].

Tabella 6 ■ RACCOMANDAZIONI PER LA GESTIONE DEI PIÙ IMPORTANTI EVENTI AVVERSI CONSEGUENTI ALLA VACCINAZIONE PRIMARIA CONTRO IL VAIOLO

| Evento | Frequenza <small>(casi/milione di vaccinati)</small> | Patogenesi | Manifestazioni cliniche | Trattamento | Prevenzione |
|--------------------------|--|---|---|--|---|
| Vaccinia progressivo | 0,9-1,5 | Immunodeficienza | La lesione al sito non si risolve con comparsa di numerose nuove lesioni | IGV 10 mL/Kg ± cidofovir | Non vaccinare soggetti immunodeficienti |
| Eczema vaccinatium | 10,4-38,5 | Deficit di linfociti T e autoinoculazione di vaccinia da 1 sito vaccinale | Lesioni cutanee multiple ed infezioni batteriche | IGV 0,6 mL/Kg ± cidofovir ± terapia antibiotica | Non vaccinare pazienti con eczema o dermatite atopica |
| Vaccinia congenito | Riportati <50 casi | Infezione del feto | Lesioni cutanee estese alla nascita | IGV | Non vaccinare donne in gravidanza |
| Inoculazione accidentale | 25,4-529,2 | Autoinoculazione | Lesioni come nel sito vaccinale dopo 7-10 giorni dall'autoinoculazione | Se poche lesioni, nessun trattamento; per lesioni multiple IGV 0,6 mL/Kg | Non vaccinare pazienti con lesioni cutanee estese |
| Encefalite postvaccinale | 2,9-12,3 | Sconosciuta; probabilmente autoimmune | 7-14 giorni dopo vaccinazione comparsa di cefalea, letargia e mielite | Terapia di supporto | Nessuna condizione predisponente conosciuta |
| Cheritite vaccinica | Sconosciuta | Autoinoculazione (frequente) o malattia oculare sottostante | Ulcere corneali 7-10 giorni dopo la vaccinazione | Vidarabina topica o trifluridina topica | Non vaccinare soggetti con malattie infiammatorie dell'occhio; osservare una corretta igiene. |
| Vaccinia generalizzato | 23,4-241,5 | Disseminazione ematica | Comparsa dopo 6-9 giorni di lesioni tipiche ma più piccole e con più veloce risoluzione | IGV | |

Abbreviazioni: IGV, Immunoglobuline specifiche anti *vaccinia virus*

Fonte: [52,60]

Bibliografia

1. World Health Organization. Fact sheet on smallpox. Disponibile su: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/smallpox/en/>.
2. Neff JM. VariolaVariola (Smallpox) and Monkeypox viruses. Pp. 1555-6. In Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. Churchill Livingstone. Fifth Edition.
3. Fenner F, Henderson DA, Arita I, et al. Smallpox and its eradication. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 1988.
4. Center for Infectious Disease Research & Policy. Smallpox: Current, comprehensive information on pathogenesis, microbiology, epidemiology, diagnosis, treatment, and prophylaxis. March 1, 2008. Disponibile su: <http://www.cidrap.umn.edu/cidrap/content/bt/smallpox/biofacts/smlpx-summary.html>.
5. Wehrle PF, Posch J, Richter KH, et al. An airborne outbreak of smallpox in a German hospital and its significance with respect to other recent outbreaks in Europe. *Bull WHO* 1970;43:669-79.
6. Breman JG, Henderson DA. Diagnosis and management of smallpox. *N Engl J Med* 2002;346:1300-8.
7. Bhatnagar V, Stoto MA, Morton SC, et al. Transmission patterns of smallpox: systemic review of natural outbreaks in Europe and North America since World War II. *BMC Public Health* 2006; 6:126.
8. Centers for Disease Control and Prevention. Laboratory associated smallpox—England. *MMWR* 1978;27:319-20.
9. Kiang KM, Krathwohl MD. Rates and risks of transmission of smallpox and mechanisms of prevention. *J Lab Clin Med* 2003;142:229-38.
10. Centers for Disease Control and Prevention. Smallpox response plan and guidelines. Infection Control Measures for Healthcare and Community Settings. Nov 26, 2002. Version 3.0. Disponibile su: <http://www.bt.cdc.gov/agent/smallpox/response-plan/index.asp>.
11. Gani R, Leach S. Transmission potential of smallpox in contemporary populations. *Nature* 2001;414:748-51
12. Centers for Disease Control and Prevention. Bioterrorism Agents/Diseases. Category A. Disponibile su: <http://www.bt.cdc.gov/agent/agentlist-category.asp#a>. Consultato il: 18-12-2007.
13. World Health Organization. Sixtieth World Health Assembly. Wha60.1. Agenda Item 12.2 18 May 2007. Smallpox Eradication: Destruction Of VariolaVariola virus Stocks. Disponibile su: http://Www.Who.Int/Gb/Ebwha/Pdf_Files/Wha60/A60_R1-En.Pdf.
14. Legrand J, Viboud C, Boelle PY, Valleron AJ, Flahault A. Modelling responses to a smallpox epidemic taking into account uncertainty. *Epidemiol Infect* 2004;132:19-25.
15. Rao AR. Smallpox. Bombay, India: Kothari Book Depot, 1972.
16. Koplan JP, Foster SO. Smallpox: clinical types, causes of death, and treatment. *J Infect Dis* 1979;140:440-1.
17. Sarkar JK, Chatterjee SN, Mitra AC, et al. Antibody response in haemorrhagic smallpox. *Indian J Med Res* 1967;55:1143-9.
18. Downie AW, Fedson DS, Saint Vincent L, et al. Haemorrhagic smallpox. *J Hyg* 1969;6:619-29.
19. Nishiura H. Smallpox during pregnancy and maternal outcomes. *Emerg Infect Dis* 2006;1:1119-21
20. Centers for Disease Control and Prevention. Acute, generalized vesicular or pustular rash illness testing protocol in the United States. Disponibile su: <http://www.bt.cdc.gov/agent/smallpox/diagnosis/rashtestingprotocol.asp>.
21. Centers for Disease Control and Prevention. Human monkeypox-Kasai Oriental, Zaire, 1996-1997. *MMWR* 1997;46:304-7.
22. Jezek Z, Szczeniowski M, Pauluku KM, et al. Human monkeypox: clinical features of 282 patients. *J Infect Dis* 1987;156:293-8.

23. Henderson DA, Inglesby TV, Bartlett JG, et al. Smallpox as a biological weapon: medical and public health management. *JAMA* 1999;281:2127-39.
24. Carletti F, Di Caro A, Calcaterra S, Grolla A, Czub M, Ippolito G, Capobianchi MR, Horejsh D. Rapid, differential diagnosis of orthopox- and herpesviruses based upon real-time PCR product melting temperature and restriction enzyme analysis of amplicons. *J Virol Methods* 2005;129:97-100.
25. Franz DR, Jahrling PB, Friedlander AM, et al. Clinical recognition and management of patients exposed to biological warfare agents. *JAMA* 1997;278:399-411.
26. Roy CJ, Baker R, Washburn K, et al. Aerosolized cidofovir is retained in the respiratory tract and protects mice against intranasal cowpox virus challenge. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:2933-7.
27. SIGA. SIGA announces successful completion of its smallpox drug candidate's initial human safety trial. 2006 Jul 13. Disponibile su: <http://www.siga.com/press/071306.html>.
28. Chen Z, Earl P, Americo J, et al. Chimpanzee/human mAbs to vaccinia virus B5 protein neutralize vaccinia and smallpox viruses and protect mice against vaccinia virus. *Proc Natl Acad Sci* 2006;103:1882-7.
29. Irons JV, Sullivan D, Cook EB, et al. Outbreak of smallpox in the lower Rio Grande Valley of Texas in 1949. *Am J Public Health* 1953;43:25-9.
30. Istituto Superiore di Sanità. Vaiolo. 10 Maggio 2007. Disponibile su: <http://www.epicentro.iss.it/problemi/vaiolo/vaiolo.asp>. Consultato il: 10-12-2007.
31. Ministero della Salute. Unità di crisi. Agenti biologici classe A. Circolare Prot. 400.3/120.33/4545. 12 Ottobre 2001.
32. Frey SE, Newman FK, Cruz J, et al. Dose-related effects of smallpox vaccine. *N Engl J Med* 2002;346:1275-80.
33. Talbot TR, Stapleton JT, Brady RC, et al. Vaccination success rate and reaction profile with diluted and undiluted smallpox vaccine: a randomized controlled trial. *JAMA* 2004;292:1205-12.
34. Kim SH, Yeo SG, Jang HC, et al. Clinical responses to smallpox vaccine in vaccinia-naïve and previously vaccinated populations: undiluted and diluted Lancy-Vaxina vaccine in a single-blind, randomized, prospective trial. *J Infect Dis* 2005;192:1066-70.
35. Kim SH, Yeo SG, Cho JH, et al. Cell-mediated immune responses to smallpox vaccination. *Clin Vaccine Immunol* 2006;13:1172-4.
36. Hsieh SM, Chen SY, Sheu GC, et al. Clinical and immunological responses to undiluted and diluted smallpox vaccine with vaccinia virus of Lister strain. *Vaccine* 2006;24:510-5.
37. Couch RB, Winokur P, Edwards KM, et al. National Institute of Allergy and Infectious Diseases Smallpox Vaccine Study Group. Reducing the Dose of Smallpox Vaccine Reduces Vaccine-Associated Morbidity without Reducing Vaccination Success Rates or Immune Responses. *J Infect Dis* 2007;195:826-32.
38. Belshe RB, Newman FK, Frey SE, et al. Dose-dependent neutralizing-antibody responses to vaccinia. *J Infect Dis* 2004;189:493-7.
39. Centers for Disease Control and Prevention. Vaccinia (smallpox) vaccine: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP), 2001. *MMWR* 2001;50:1-25.
40. Kim SH, Bang JW, Park KH, et al. Prediction of residual immunity to smallpox, by means of an intradermal skin test with inactivated vaccinia virus. *J Infect Dis* 2006;194:377-84.
41. Slifka MK. The future of smallpox vaccination: is MVA the key? *Med Immunol* 2005;4:2.
42. Hooper JW, Golden JW, Ferro A, et al. Smallpox DNA vaccine delivered by novel skin electroporation device protects mice against intranasal poxvirus challenge. *Vaccine* 2007;25:1814-23.
43. Coulibaly S, Burhl P, Mayrhofer J, et al. The nonreplicating smallpox candidate vaccines defective vaccinia Lister (dVV-L) and modified vaccinia Ankara (MVA) elicit robust long-term protection. *Virology* 2005;341:91-101.
44. Tang J, Murtadha M, Schnell H. Human T-cell responses to vaccinia envelope proteins. *J Virol* 2006;80:10010-20.
45. World Health Organization. Health Topics:

- Smallpox: Smallpox Vaccine. Disponibile su: <http://www.who.int/vaccines/en/smallpox.shtml>.
46. Lewis FM, Chernak E, Goldman E, et al. Ocular vaccinia infection in laboratory worker, Philadelphia, 2004. *Emerg Infect Dis* 2006;12:134-7.
 47. Dixon CW. Smallpox in Tripolitania, 1946: an epidemiological and clinical study of 500 cases, include trias of penicillin treatment. *J Hygiene* 1948;46:351-77.
 48. Guha Mazumder DN, De S, Mitra AC, et al. Clinical observations on smallpox: a study of 1.233 patients admitted to the infectious diseases hospital, Calcutta, during 1973. *bull WHO* 1975;52:301-6.
 49. Centers for Disease Control and Prevention. Smallpox pre-vaccination information packet. Disponibile alla pagina web: <http://www.bt.cdc.gov/agent/smallpox/vaccination/infopacket.asp>.
 50. Cummings JF, Polhemus ME, Hawkes C, et al. Persistence of vaccinia at the site of smallpox vaccination. *Clin Infect Dis* 2008; 46. In press. Disponibile su: <http://www.journals.uchicago.edu/CID/journal/issues/v46n1/51937/51937.web.pdf>.)
 51. Centers for Disease Control and Prevention. Smallpox vaccination and adverse reactions: guidance for clinicians. *MMWR* 2003;52:1-29.
 52. Bartlett J, Borio L, Radonovich L, Mair JS, O'Toole T, Mair M, Halsey N, Grow R, Inglesby TV. Smallpox vaccination in 2003: key information for clinicians. *Clin Infect Dis* 2003;36:883-902.
 53. Centers for Disease Control and Prevention. Recommendations for using smallpox vaccine in a pre-event smallpox vaccination program. Supplemental recommendations of ACIP and HICPAC. *MMWR*;52:1-16.
 54. Bavarian Nordic 2007: IMVAMUNE: clinical development 2007. Disponibile su: http://www.bavarian-nordic.com/imvamune_clinical_development.
 55. Goldstein J, Neff J, Lane J, Koplan J. Smallpox vaccination reactions, prophylaxis, and therapy of complications. *Pediatrics* 1975; 55:3427.
 56. Lane JM, Ruben FL, Neff JM, Millar JD. Complications of smallpox vaccination 1968: results of ten statewide surveys. *J Infect Dis* 1970; 122: 303-9.
 57. Lane JM, Ruben FL, Neff JM, Millar JD. Complications of smallpox vaccination 1968. National surveillance in the United States. *N Engl J Med* 1969; 281: 1201-8.
 58. Circolare del Ministero della Salute Unità di Crisi Prot. 400.3/120.33/4786 del 23/10/2001.
 59. Siegel JD, Rhinehart E, Jackson M, Chiarello L, and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee, 2007 Guidelines for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings, June 2007. Disponibile su: http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf/isolation_2007.pdf.
 60. Casey C, Vellozzi C, Mootrey GT, Chapman LE, McCauley M, Roper MH, Damon I, Swerdlow DL. Surveillance Guidelines for Smallpox Vaccine (vaccinia) Adverse Reactions *MMWR RR* 2006; 55:1-16.